

# THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba ;	TORASABURO ARAKI, Kyoto ;	KIKO GOTO, Kyoto ;
MOTONOSUKE GOTO, Fukuoka ;	KIKUNAE IKEDA, Tokyo ;	KATSUJI INOUE, Sendai ;
TOSHIHARU IWANO, Hofen ;	SHICHIZO KATO, Kumamoto ;	MOTOZO KAWAKITA, Niigata ;
SHIGERU KOMATSU, Kyoto ;	YASHIRO KOTAKE, Osaka ;	KANAVE MAYEDA, Kyoto ;
LEONOR MICHAELIS, Nagoya ;	KOJI MIYAKE, Sapporo ;	TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo ;
KAORU OGURO, Sapporo ;	YUZURU OKUDA, Fukuoka ;	TAKAOKI SASAKI, Tokyo ;
TORAI SHIMAMURA, Tokyo ;	TAYEI SHIMIDZU, Okayama ;	KENZO SUTO, Kanazawa ;
UMETARO SUZUKI, Tokyo ;	YUTAKA TERUUCHI, Tokyo ;	MASAJI, TOMITA, Nagasaki ;
MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo ;	KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima ;	HSIEN WU, Peking.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

TOKYO

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY.

II Ichome Kagacho, Ushigome.

Price { ¥10.00 per volume, Nippon.  
\$ 5.50 per volume, other countries.



# ÜBER DEN EINFLUSS DER DUODENALEN ALKALI- ZUFUHR AUF DIE MAGENSEKRETION.

VON

TOSHITANE MATSUYAMA.

(Aus der medizinischen Klinik von Prof. Ryōkichi Inada,  
Universität zu Tokyo.)

(Eingegangen am 1. Juli 1924.)

An Hunden haben Lönqvist (1906), Sawitsch und Zeljony (1913) u. a. experimentell festgestellt, dass Soda (0,5–1,5 Proz. Lösung) von der Oberfläche des Pylorus aus die Magendrüsen zur Arbeit anregt, während es von der Oberfläche des Zwölffingerdarmes aus hemmend auf sie einwirkt. Im Einklang damit fand Pimenow (1907) beim Versuche an einem Hunde mit Kleinmagen, dass bei Einführung der Sodalösung vor dem Fressen die Soda auf die Magensekretion einen hemmenden Einfluss hat, während sie bei ihrer Einführung zusammen mit der Nahrung die Absonderung erhöht. Andererseits gibt es auch Autoren, welche nach klinischer Erfahrung behaupten, dass das Natron nur beim hyperaziden Menschen auf kurze Zeit wirkt, wenn es in den verdauenden Magen gegeben wird, und dann die Beschwerden meist von neuem auftreten, während man mit kleineren Dosen auskommt und eine nachhaltigere Wirkung hat, wenn es einige Zeit vor der Mahlzeit in den nüchternen Magen verordnet wird. Jedenfalls scheint heutzutage die Meinung zu herrschen, dass das Natriumbikarbonat auch beim Menschen vom Magen aus auf die Magensekretion steigernd und vom Duodenum aus hemmend wirkt. Aber die Resultate der Untersuchungen, welche von vielen Autoren über die Wirkungsweise des per os gegebenen Mittels auf die Magensekretion ausgeführt wurden, stimmen nicht

überein und sprechen sogar sehr häufig gegen die eben erwähnte Ansicht. Es gibt nämlich viele Autoren (Linossier und Lemoine (1893), Mathieu und Hallot (1894), Montagnon (1898)), welche gefunden haben, dass das vor der Mahlzeit verabreichte Natron eher steigend auf die Magensekretion gewirkt hat. Auf der anderen Seite konnte Reichmann (1895) weder durch kleine noch durch grosse Natrongaben, sowohl vor der Mahlzeit, wie während der Verdauung verabreicht, eine andere als einfach neutralisierende Wirkung des Alkalisalzes konstatieren. In jüngster Zeit hat Kawashima (1923) an hyperaziden Kranken gefunden, dass 2-3 g Bikarbonat keine nennenswerte herabsetzende Wirkung auf die Magensekretion ausübt, indem das 1/2-1 Stunde vor der Mahlzeit gegebene Mittel gar nicht und das direkt nach dem Essen verabreichte nur unbedeutend die Azidität des Mageninhaltes herabsetzt, während bei einer 1/2 Stunde nach der Mahlzeit vorgenommenen Alkalizufuhr in den meisten Fällen eine vorübergehende Aziditätsabnahme zustande kommt, welcher aber in einem Drittel der Fälle in der Nachperiode ein Anstieg der Azidität folgt. Beim Gebrauch einer grösseren Dose Bikarbonat (5,0) tritt die Sekretionsabnahme deutlicher in die Erscheinung, indem das 1/2 Stunde nach dem Essen gegebene Mittel fast in sämtlichen Fällen eine deutliche und sogar bis zum Ende der Verdauung fortdauernde Hemmung auf die Magensekretion ausübt, während eine solche Wirkung zumeist vermisst wird, wenn das Bikarbonat 1/2 oder 1 Stunde vor der Mahlzeit verordnet wird. Bei solcher Sachlage muss gefragt werden, ob die Wirkung des Alkalis auf die Magensekretion in der Tat auch beim Menschen wie beim Hunde sich verhält. Für diese Frage muss die Untersuchung über die Wirkung des direkt ins Duodenum eingeführten Natriumbikarbonates auf die Magensekretion eine entscheidende Bedeutung haben. Weil meines Wissens eine solche Untersuchung bis jetzt noch fehlt, so habe ich die Frage auf Veranlassung und unter der Leitung von Proff. R. Inada und K. Sakaguchi aufgenommen.

I. DER EINFLUSS DES DIREKT VOR DER MAHLZEIT  
DUODENAL ZUGEFÜHRTEN ALKALIS AUF DIE  
MAGENSEKRETION.

Bei dieser Untersuchung habe ich in Kontrollversuchen den Versuchspersonen das Probefrühstück verabreicht und nach einer Stunde die Azidität des ausgeheberten Mageninhaltes bestimmt, während in den Hauptversuchen 1–5 g Natriumbikarbonat in 50 cem Wasser gelöst direkt vor dem Probefrühstück duodenal zugeführt wurden.

TABELLE I.

Versuche mit duodenaler Zufuhr von 2 g Natriumbikarbonat.

Untersuchungs- nummer.		Kontrollversuch	2 g $\text{NaHCO}_3$ duodenal zugeführt	Unterschied	Untersuchungs- nummer	Kontrollversuch	2 g $\text{NaHCO}_3$ duodenal zugeführt	Unterschied	Kontrollversuch	2 g $\text{NaHCO}_3$ duodenal zugeführt	Unterschied
1	Gesamtazid. freie HCl.	34,5 24,6	27,5 18,9	-7,0 -5,7	6				25,0 18,0	8,0 0	-20,0 -18,0
2	Gesamtazid. freie HCl.	40,4 32,0	39,0 30,0	-1,4 -2,0	7				45,6 32,0	45,4 33,8	-0,2 +1,8
3	Gesamtazid. freie HCl.	47,5 40,5	56,5 46,8	+9,0 +6,3	8				35,3 22,8	19,9 8,7	-15,4 -14,1
4	Gesamtazid. freie HCl.	44,5 31,5	33,5 16,7	-11,0 -14,8	9				48,5 41,0	51,6 41,6	+3,1 +3,0
5	Gesamtazid. freie HCl.	28,0 13,0	32,6 19,5	+4,0 +6,5	10				55,6 34,7	60,6 34,2	+5,0 -0,5

TABELLE II.

Versuche mit duodenaler Zufuhr von 5 g Natriumbicarbonat.

Untersuchungs- nummer	Gesamtazid. freie HCl	Kontrollversuch	5 g $\text{NaHCO}_3$ duodenal zugeführt	Unterschied	Untersuchungs- nummer	Kontrollversuch	5 g $\text{NaHCO}_3$ duodenal zugeführt	Unterschied	Untersuchungs- nummer	Kontrollversuch	5 g $\text{NaHCO}_3$ duodenal zugeführt	Unterschied
1.		29,0 freie HCl 17,0	28,0 15,0	-1,0 -2,0	6.	61,0 47,6	45,0 36,0	-16,0 -11,6	11.	68,4 56,6	72,7 61,0	+4,3 +4,4
2.		76,0 freie HCl 58,4	20,6 10,4	-55,4 -48,0	7.	80,0 67,0	70,0 57,0	-10,0 -10,0	12.	27,0 16,6	8,6 0	-18,4 -16,6
3.		14,0 freie HCl 8,0	10,0 0	-4,0 -8,0	8.	54,0 41,0	51,0 36,0	-3,0 -5,0	13.	55,6 34,7	16,0 7,6	-39,6 -27,1
4.		16,0 freie HCl 5,6	2,0 0	-14,0 -5,6	9.	38,6 25,6	12,4 3,8	-26,2 -18,8	14.	39,6 27,2	12,4 7,6	-27,2 -19,6
5.		69,0 freie HCl 46,8	52,8 40,8	-16,8 -6,0	10.	21,0 12,0	10,6 3,4	-10,4 -9,4	15.	23,8 18,8	11,2 4,4	-17,6 -14,4

Aus der Tabelle I kann man ersehen, dass die Zufuhr von 2 g Bikarbonat ins Duodenum keine deutliche Herabsetzung der Azidität nach sich zieht. Heir wurde die Abnahme des Säuregrades bei zehn Versuchen in sieben Fällen nur viermal gefunden, während in den übrigen sechs Versuchen die Azidität nach der Alkalizufuhr fast gleich oder oft höher ausfiel als bei Kontrollversuchen. Hingegen bei Zufuhr von 5 g Bikarbonat war, wie die Tabelle II zeigt, die Aziditätsabnahme deutlicher, so dass der Säuregrad bei 15 Versuchen in 9 Fällen zwölfmal nach der Alkalizufuhr gegen die Kontrollversuche mehr oder minder herabgesetzt gefunden wurde. Dabei wurde die Abnahme über 10 elfmal getroffen und zwar war sie bei zwei Versuchen im Fall VII sehr auffallend, so dass die Abnahme der Gesamtazidität und der freien Salzsäure 55,4 und 48,0 resp. 39,6 und 27,1 betrug. Bei dieser Sachlage liegt der Gedanke nahe, dass das direkt vor der Mahlzeit duodenal zugeführte Alkali auch beim Menschen auf die Magensekretion herabsetzend einwirkt, obwohl die hemmende Wirkung von der Alkalimenge abhängt, so dass sie bei Zufuhr von 2 g Bikarbonat nur undeutlich und erst beim Gebrauche von 5 g in auffallender Weise zum Vorschein kommt.

Um zu wissen, ob dieser Unterschied von der Alkalimenge oder von der Konzentration der zugeführten Alkalilösung abhängt, habe ich zunächst die Untersuchung mit 20 ccm von 10 Proz. Bikarbonatlösung wiederholt. Hier ist die Konzentration der Alkalilösung gleich, aber die Alkalimenge (2 g) kleiner als bei den in der Tabelle II angegebenen Versuchen.

Im Falle 1 der Tabelle III beobachtete man beim Versuche mit Alkalizufuhr eine starke Abnahme der freien Salzsäure, obwohl die Gesamtazidität dabei nur eine geringfügige Verminderung zeigte. Wie unten genauer geschildert wird, beruhte wohl diese Erscheinung wesentlich auf dem Rückfluss der duodenal zugeführten Alkalilösung in den Magen und nicht auf der Herabsetzung der Säuresekretion. In den Fällen 2 und 3 wurde bei Alkalizufuhr eine deutliche Aziditätsabnahme vermisst; die dort beobachtete

TABELLE III.

Unter- suchungs- nummer		Kontroll- versuch	Versuch mit duodenaler Alkalizufuhr	Unterschied
1	Gesamtazid. freie HCl	32,4 19,8	5,8 0	-6,6 -19,8
2	Gesamtazid. freie HCl	82,9 67,2	80,4 64,4	-2,2 -2,8
3	Gesamtazid. freie HCl	67,0 57,0	59,2 48,6	-7,8 -8,4
4	Gesamtazid. freie HCl	45,0 30,0	55,0 44,0	+10,0 +14,0

leichte Abnahme bleibt innerhalb der physiologischen Variationsbreite und hat keine Bedeutung. Im Falle 4 wurden beim Alkaliversuche eher etwas höhere Säurewerte gefunden. Kurz, in dieser Versuchsanordnung war die die Magensekretion herabsetzende Wirkung des Alkalis nicht auffallend.

## II. VERSUCHE MIT DER EINE ODER ZWEI STUNDEN VOR DER MAHLZEIT Vorgenommenen DUODENALEN ALKALIZUFUHR.

Weil bei Versuchen von Fimenow an Hunden, wo die Sodalösung in den grossen Magen eingegossen wurde, der hemmende Einfluss besonders dann deutlich war, wenn die Alkalizufuhr  $1\frac{1}{2}$  oder 2 Stunden vor der Fütterung vorgenommen wurde, so muss auch bei unseren Untersuchungen gefragt werden, wann die hemmende Wirkung des ins Duodenum eingeführten Alkalis am stärksten in die Erscheinung tritt. Um dieser Frage näher zu kommen und zugleich die Wirkungsdauer des duodenal zugeführten Alkalis kennen zu lernen, habe ich in den folgenden Versuchen 5 g Bikarbonat in 50 cem Wasser gelöst eine resp. zwei Stunden vor dem Probefrühstück ins Doudenum eingegossen und dessen Einfluss auf die Magensekretion untersucht.

Die Tabelle zeigt, dass die Magenazidität bei der eine oder

TABELLE IV.

Untersuchungsnummer	Zeit der duodenalen Alkalizufuhr	Eine Stunde vor dem Frühstück			Zwei Stunden vor dem Frühstück		
		Kontrollversuch	Versuch mit Alkalizufuhr	Unterschied	Kontrollversuch	Versuch mit Alkalizufuhr	Unterschied
1	Gesamtazid.	60,8	37,5	-23,3	60,8	72,8	+12,0
	freie HCl	45,2	21,6	-23,6	45,2	54,5	+9,3
2	Gesamtazid.	22,6	23,3	+0,7	22,6	33,3	+10,7
	freie HCl	12,6	1,0	-11,6	12,6	13,6	+1,0
3	Gesamtazid	59,0	55,0	-4,0	59,0	57,0	-2,0
	freie HCl	46,6	39,0	-7,6	46,6	42,8	-3,8
4	Gesamtazid.	89,5	72,0	-17,5	89,5	59,0	-30,5
	freie HCl	70,0	59,0	-11,0	70,0	42,0	-28,0
5	Gesamtazid	54,0	56,0	+2,0	54,0	52,8	-1,2
	freie HCl	41,0	45,0	+4,0	41,0	39,4	-1,6
6	Gesamtazid.	38,6	26,6	-12,0	38,6	28,0	-10,6
	freie HCl	25,6	17,2	-8,4	25,6	16,8	-8,8
7	Gesamtazid.	21,0	33,6	+12,6	21,0	44,8	+23,8
	freie HCl	12,0	24,2	+12,2	12,0	28,9	+15,2

zwei Stunden vor der Mahlzeit vorgenommen Alkalizufuhr nicht so deutlich herabsinkt, wie bei den vorangehenden Versuchen, wo gleiche Mengen Alkali direkt vor dem Probefrühstück verabreicht wurde. Hieraus muss man schliessen, dass die Sekretionshemmung beim Menschen bald nach der Eingiessung der Alkalilösung in

die Erscheinung tritt und nur eine kurze Zeit fort dauert, so dass die Wirkung schon nach einer Stunde undeutlich wird.

Die oben erwähnte Tatsache, dass die duodenale Alkalizufuhr in Wirklichkeit die Magensekretion herabsetzt, und dass diese Erscheinung aber erst dann in die Erscheinung tritt, wenn das Alkali in genügender Dose und zwar direkt vor der Mahlzeit gegeben wird, gibt eine wichtige theoretische Grundlage für die Gebrauchsweise des Alkalis am Krankenbette. Wenn man also Natriumbikarbonat nicht einfach zur Neutralisierung der Magensäure, sondern zur Hemmung ihrer Sekretion verordnen will, so muss man das Mittel in grosser Dose, wenigstens mehrere Gramm auf einmal, kurz vor der Mahlzeit geben.

### III. RÜCKFLUSS DER INS DUODENUM EINGEGOSSENEN ALKALILÖSUNG IN DEN MAGEN.

Durch meine oben auseinander gesetzten Untersuchungen wurde zunächst festgestellt, dass das duodenal u. z. direkt vor dem Essen zugeführte Alkali die Azidität des Mageninhaltes sehr häufig herabsetzt. Damit ist aber noch nicht erwiesen, dass diese Abnahme wesentlich dadurch zustande kommt, dass das Alkali von der Oberfläche des Zwölffingerdarmes auf die Magensekretion hemmend eingewirkt hat. Weil die alkalische Flüssigkeit einen Schlussreflex des Pylorus nicht zur Folge hat, so ist es auch möglich, dass bei der duodenalen Zufuhr des Alkalis ein Teil davon in den Magen zurückfliesst und so die Magensäure teilweise neutralisiert wird. Dafür spricht die Erscheinung, dass in einigen Versuchen (Tabelle III, Fall 1 und Tabelle IV, Fall 1, 13. u. 18. XI.) bei Alkalizufuhr nur die freie Salzsäure stark herabsank, während die Abnahme der Gesamtazidität dabei ganz unbedeutend war. Wie bekannt reagiert die Bikarbonatlösung auf Kongorot stärker alkalisch als auf Phenolphthalein, und die Kohlensäure auf letzteres sauer, aber nicht auf ersteres. Wenn man den Magensaft mit Natriumbikarbonat teilweise neutralisiert, so bleibt die dabei frei gewordene Kohlensäure teilweise in der Flüssigkeit

TABELLE V.

Unter- suchungs- nummer		Zeit der duodenalen Alkalizufuhr					
		direkt vor dem Frühstück			eine Stunde vor dem Frühstück		
		Kontroll- versuch	Versuch mit Alkalizu- fuhr	Unter- schied	Kontroll- versuch	Versuch mit Alkalizu- fuhr	Unter- schied
1	Gesamtazid.	21,0	10,6	-10,4			
	freie HCl	12,0	3,4	-8,6			
	Gesamtchlor(%)	0,20	0,18	-0,02			
	(für n/10 HCl umgerechnet ccm)			(-5,9)			
2	Gesamtazid.	23,8	11,2	-17,6			
	freie HCl	13,8	4,4	-14,4			
	Gesamtchlor(%)	0,21	0,19	-0,05			
	(für n/10 HCl umgerechnet ccm)			(-14,1)			
3	Gesamtazid.	33,6	12,4	-26,2	38,6	26,6	-12,0
	freie HCl	25,6	6,8	-18,8	25,6	17,2	-8,4
	Gesamtchlor(%)	0,29	0,17	-0,12	0,23	0,24	0,05
	(für n/10 HCl umgerechnet ccm)			(-33,9)			(-14,1)
4	Gesamtazid.	39,6	12,4	-27,2			
	freie HCl	27,2	7,6	-19,6			
	Gesamtchlor(%)	0,29	0,21	0,08			
	(für n/10 HCl umgerechnet ccm)			(-22,5)			

gelöst und hieraus folgt, dass der Gehalt der freien Salzsäure dabei bedeutend, die Gesamtazidität aber nur in geringerem Grade herabsinkt.

Weil aber eine solche Erscheinung bei meinen zahlreichen Untersuchungen nur selten beobachtet wurde, so liegt der Gedanke

nahe, dass der Rückfluss der ins Duodenum eingegessenen Alkalilösung für die Abnahme der Magenazidität keine grosse Rolle spielt. Um sicherzustellen, wie die Sache in Wirklichkeit liegt, habe ich in folgenden Versuchen den Einfluss der Alkalizufuhr auf den Chlorgehalt wie die Azidität des Mageninhaltes untersucht. Bei Verminderung der Magensekretion müssen der Chlorgehalt, die Gesamtazidität und freie Salzsäure parallel heruntergehen, während beim Rückfluss der duodenal zugeführten Bikarbonatlösung die freie Salzsäure sehr auffallend, die Gesamtazidität aber und der Chlorgehalt nur in geringerem Grade dadurch beeinflusst werden müssen. Als Untersuchungsmaterial habe ich hier nur solche Fälle gewählt, in denen die duodenale Alkalizufuhr auf die Magensekretion deutlich herabsetzend wirkte.

Aus der Tabelle V ersicht man, dass die Gesamtazidität und der Chlorgehalt in allen meinen Alkaliversuchen mit der freien Salzsäure zusammen fast in Parallele herunterging, was darauf hindeutet, dass die Magensekretion in diesen Fällen in Wirklichkeit abnahm.

Hier sei erwähnt, dass die oben erwähnte inkongruente Abnahme der Gesamtazidität und der freien Salzsäure nur im Falle I und hier ziemlich häufig zustande kam, während eine solche Erscheinung bei anderen Fällen vermisst wurde. Es scheint also, dass die Neigung zum Rückfluss individuell ungleich ist.

#### IV. WIE WIRD DIE MAGENSEKRETION DURCH DAS DUODENAL ZUGEFÜHRTE ALKALI GEHEMMT ?

Durch meine oben erwähnten Versuche wurde zunächst festgestellt, dass die Magensekretion nach der duodenalen Alkalizufuhr sehr häufig abnimmt, während eine solche Erscheinung bei rektaler Alkalizufuhr, wie ich (1924) in vorangehender Arbeit mitteilte, gewöhnlich vermisst wird. Dieser Unterschied könnte wohl darauf beruhen, dass die Resorption des Alkalis im Zwölffingerdarne rascher von statten geht als im Dickdarne und so die

TABELLE VI.

Untersuchungs- Nummer		Gesamtazidität	Freie HCl	CO <sub>2</sub> -bindungsvermögen	
				Vor dem Essen	1/2 Std. nach dem Essen
1	Kontrolle	24.0	17.6	59.8	64.1
	Alkalizufuhr	11.5	6.0	55.2	109.3
2	Kontrolle	36.2	21.0	51.4	61.2
	Alkalizufuhr	34.0	25.4	59.8	67.7
3	Kontrolle	56.5	46.5	57.5	68.3
	Alkalizufuhr	40.0	29.0	73.6	73.7
4	Kontrolle	50.4	40.8	58.6	58.4
	Alkalizufuhr	41.0	31.8	62.7	70.5
5	Kontrolle	43.1	26.0	63.2	80.5
	Alkalizufuhr	44.1	27.0	76.9	110.7
6	Kontrolle	87.2	67.2	65.4	82.7
	Alkalizufuhr	87.2	74.4	63.0	109.2
7	Kontrolle	62.0	53.8	67.6	77.7
	Alkalizufuhr	65.0	53.2	65.8	76.6
8	Kontrolle	61.2	46.6	66.7	66.8
	Alkalizufuhr	56.2	42.0	64.5	71.8

Alkaleszenz des Blutes, folglich auch die Magensäurebildung, dort stärker als hier beeinflusst wird, oder dass der reflektorische Hemmungsimpuls von der Duodenalschleimhaut aus durch Alkali stärker ausgelöst wird als von der Dickdarmschleimhaut aus.

Um zuerst zu wissen, wie stark das in das Blut resorbierte Alkali auf die Absonderung der Magensäure hemmend einwirkt, habe ich in den folgenden Versuchen direkt vor der Aufnahme des Probefrühstückes 50 ccm von 10 Proz. Bikarbonatlösung intravenös injiziert und deren Einfluss auf die Magensekretion untersucht. In einigen Versuchen habe ich zugleich das Kohlensäurebindungsvermögen des Blutplasmas, einmal direkt vor der Alkalizufuhr und ein anderes Mal 1/2 Stunde nach der Aufnahme des Probefrühstückes, nach Van Slyke bestimmt.

Aus der Tabelle VI ersieht man, dass die Magensekretion durch die intravenöse Alkalizufuhr zumeist nicht deutlich herabgesetzt wird. Wenn im Fall 3 auch beim Alkaliversuche die Magenazidität ziemlich deutlich niedriger als beim Kontrollversuche gefunden wurde, so kann man diesen Unterschied nicht ohne weiteres als die Wirkung der Alkaliinjektion betrachten, weil das Kohlensäurebindungsvermögen an diesem Tage schon vor der Alkalizufuhr durch eine unbekannte Ursache gesteigert war. Das Kohlensäurebindungsvermögen steigt auch in Kontrollversuchen nach der Aufnahme des Probefrühstückes ein wenig an, aber eine halbe Stunde nach der Alkalizufuhr beobachtet man in der Mehrzahl der Fälle keinen besonderen Einfluss. Es gibt aber auch Fälle, wo das Kohlensäurebindungsvermögen in einer halben Stunde nach der Alkaliinjektion einen deutlichen Anstieg zeigt. Weil es keinem Zweifel unterliegt dass das Kohlensäurebindungsvermögen im Momente der intravenösen Alkalizufuhr deutlich ansteigt, so muss man aus diesem Befunde annehmen, dass das in den Kreislauf gelangende überschüssige Alkali zumeist in kurzer Zeit aus dem Blute beseitigt und wahrscheinlich im Gewebe zurückgehalten wird. Hier sei besonders bemerkt, dass zwischen dem Anstieg des Kohlensäurebindungsvermögens nach der Alkalizufuhr und der Herabsetzung der Magenazidität kein direkter Parallelismus besteht. Z. B. in

TABELLE VII.

Hund Nr. 3. 10,39 kg.														Hund Nr.4. 9,50 kg.	
Versuch I.				Versuch II.			Versuch III.				Kontrollversuch	1 g NaHCO <sub>3</sub> intravenös injiziert			
Kontrollversuch	1 g NaHCO <sub>3</sub> intravenös injiziert	Kontrollversuch	0,5 g NaHCO <sub>3</sub> intravenös injiziert	Kontrollversuch	0,5 g	30. III.	31. III.	Kontrollversuch	Natriumbikarbonat intravenös injiziert						
										24. II.			23. II.	2. III.	7. III.
Datum 1923															
Menge des Magensaftes in cem 1/2 Std. n. d. Fleisch- aufnahme	1	10,6	10,4	1,9	15,6	18,7	7,6	1,7	1,3	11,5	8,4				
	1 1/2	20,1	23,1	0,6	24,2	16,0	14,7	1,0	1,0	19,3	15,6				
	2	7,1	5,2	0,4	11,2	8,4	8,7	1,0	0,6	17,4	14,4				
	2 1/2	9,4	8,3	0,8	10,2	8,7	12,3	1,9	0,4	11,1	12,3				
	3	7,0	6,1	8,5	6,4	3,7	10,1	1,6	0,4	10,9	11,7				
	3 1/2	5,0	6,3	5,9	6,1	4,0	7,1	0,5	1,1	9,6	6,6				
	4	4,6	5,3	6,5	4,2	3,3	4,3	5,1	1,4	3,9	1,4				
		4,7	5,2	3,0	1,9	2,4	4,0	2,0	4,8	1,0	2,8				
Gesamtmenge	68,5	69,9	27,6	79,8	65,2	63,8	14,6	10,3	84,7	73,2					
Gesamtazidität	115,3	113,0	92,7	129,8	127,3	118,2	65,3	61,7	137,3	132,7					
freie HCl	106,2	89,8	75,4	103,2	117,0	97,8	51,3	50,1	129,0	117,7					

Menge des Magensaftes in cem

Untersuchungsnummer 5 und 6 stieg das Kohlensäurebindungsvermögen nach der Alkalizufuhr sehr deutlich an, aber die Azidität des Mageninhaltes wurde dadurch gar nicht beeinflusst.

Zunächst habe ich an Hunden mit einem isolierten kleinen Magen den Einfluss der intravenösen Alkalizufuhr auf die Magensekretion untersucht. Hier wurden als Probekost 100 g rohes Pferdefleisch gegeben und danach halbstündlich der von dem kleinen Magen herausfliessende Magensaft gesammelt und die Menge wie die Azidität bestimmt. In den Hauptversuchen wurden 5–10 ccm von 10 Proz. Bikarbonatlösung direkt vor der Nahrungsaufnahme intravenös injiziert und Einfluss auf die Sekretionsmenge wie den Säuregrad des Magensaftes untersucht.

Wie die Tabelle VII zeigt, wurden die Sekretionsmenge und die Azidität des Magensaftes nicht immer, aber oft nach der intravenösen Alkalizufuhr deutlich kleiner als bei den Kontrollversuchen gefunden. Obwohl der Einfluss des intravenös zugeführten Alkalis auf die Magensekretion beim Hunde etwas auffällender war als beim Menschen, so will ich doch daraus nicht den Schluss ziehen, dass das in das Blut eingetretene Alkali beim Hunde stärker sekretionshemmend wirkt als beim Menschen, weil die Sekretionsabnahme nur beim Versuchshunde Nr. 3 gesehen wurde und dieses Tier gerade ein Hund war, welcher bei den in vorangehender Arbeit mitgeteilten Versuchen mit rektaler Alkalizufuhr häufig eine nachweisbare Abnahme der Magensekretion zeigte, während bei anderen Hunden eine solche Erscheinung fast stets vermisst wurde, so dass angenommen wurde, dass dieser Hund besonders gegen Alkali empfindlicher als andere ist.

Nach meinen oben auseinander gesetzten Versuchen am Menschen wie an Hunden ist es wahrscheinlich, dass das Alkali nach der Resorption im Blute auch gewissermassen auf die Magensekretion hemmend einwirken kann. Aber man kann die Abnahme der Magensekretion, welche beim Eingiessen der Alkalilösung ins Duodenum sehr häufig zustande kommt, nicht ohne weiteres mit der Wirkung des resorbierten Alkalis erklären, weil die intravenöse Zufuhr von 5 g Natriumbikarbonat gewöhnlich keine deutliche

Verminderung der Magensekretion verursachte. Hier muss man also annehmen, dass das Alkali auch direkt von der Duodenalschleimhaut aus auf die Magensekretion hemmend einwirkt. Auf den ersten Blick könnte wohl das letzte Moment hier eine grössere Rolle spielen als das erstere. Aber mit diesem Schluss muss man sehr vorsichtig sein. Weil das in den Kreislauf gelangende Alkali, wie das Verhalten des Kohlensäurebindungsvermögens bei intravenöser Alkalizufuhr zeigt, bald aus dem Blutebeseitigt wird, so liegt der Gedanke nahe, dass die hemmende Wirkung des intravenös zugeführten Alkalis auf die Magensekretion auch von kurzer Dauer ist. Dagegen tritt bei der duodenalen Zufuhr das Alkali nicht auf einmal, wie bei der intravenösen Injektion, sondern allmählich in die Blutbahn ein, woraus folgt, dass die Alkalizität des Blutes und die Magensekretion dort eine längere Zeit als hier dadurch beeinflusst werden. Unter diesen Umständen ist es auch nicht unmöglich, dass die Sekretionshemmung durch resorbiertes Alkali bei der duodenalen Zufuhr insgesamt stärker ausfällt als bei der intravenösen Injektion. Welches von beiden, nämlich die Zunahme der Blutalkaleszenz durch das resorbierte Alkali oder die direkte Wirkung des Alkalis auf die Duodenalschleimhaut, für die Sekretionsabnahme bei der duodenalen Bikarbonatzufuhr eine wichtigere Rolle spielt, lässt sich schwer entscheiden. Diese Frage lasse ich vorläufig dahingestellt.

#### V. FRAKTIONIERTER UNTERSUCHUNG DES MAGENINHALTES BEI DUODENALER ALKALIZUFUHR.

In den oben erwähnten Versuchen am Menschen wurde der Mageninhalt stets eine Stunde nach dem Probefrühstück und nur einmal untersucht. Weil meine Untersuchung aber zeigte, dass die Alkaliwirkung auf die Magensekretion von kurzer Dauer ist, so wollte ich hier durch fraktionierte Untersuchung des Mageninhaltes die Veränderung der Sekretionskurve etwas genauer kennen lernen. Dazu habe ich den Mageninhalt nach Verabreichung des Probefrühstücks mit einem Rehfußschen Apparate mit kleinen Intervallen wiederholt untersucht. Bei neuen Alkaliversuchen wurde eine

TABELLE VIII.

K = Kontrollversuch; A = Versuch mit Alkalizufuhr; W = Versuch mit Wasserzufuhr.

Untersuchungsnummer	1		2		3		4		5		6		
	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	W
Datum 1924.	29. III	30. III	5. IV.	6. IV.	10. IV.	10. IV.	12. IV.	13. IV.	14. IV.	15. IV.	16. IV.	24. IV.	25. IV.
15'	5,2	0,8	9,8	1,2 gelb	7,6	7,0	2,7	23,1	16,0	4,0	5,2	12,0	0
20'	8,0	1,2	20,0	2,6	13,4	18,8	7,5	52,3	22,6	12,8	26,0	17,6	7,2
45'	10,0	—	30,0	2,6	18,5	27,1	4,5	72,0	19,2	28,0	59,0	31,0	24,2
1 Std.	22,0	—	38,0	4,8	28,0	40,1	9,1	77,4	14,0	44,8	72,8	37,2	21,6
1 1/2	25,2	12,0	36,6	8,8	32,0	40,1	18,4	73,0	52,4	67,8	75,0	52,4	33,8
2	45,6	12,0	34,2	26,2	19,4 gelb	49,1	20,8	62,7	53,8	81,6	78,0	43,2	31,0
2 1/2	50,2	44,6	32,6	20,6	12,4 gelb	48,7	21,0	59,1	48,4	67,7	44,0	18,2	32,0
3	51,2	37,2	38,0	8,0	4,6 gelb	49,6	34,9	70,1	29,8 (gelb)	64,5	14,6	9,4	5,5
15'	2,2	0	6,8	0(-21,0) (gelb)	4,4	3,1	0(-8,0)	21,4	13,2	2,0	1,6	0	0
20'	4,8	0	10,8	0(-12,0)	6,2	14,5	0(-2,1)	47,6	18,4	9,8	14,0	0	0
45'	6,0	—	21,6	0(-12,0)	8,0	21,6	0(-4,0)	64,5	14,4	22,0	43,6	13,2	8,0
1 Std.	12,2	—	27,0	0(-5,0)	13,6	27,8	0(-0,8)	72,2	9,2	33,6	60,4	16,8	8,2
1 1/2	13,0	5,0	26,0	0 neutral	16,0	29,6	8,0	59,7	44,8	57,6	62,0	28,4	14,6
2	32,8	5,0	23,8	14,4	9,6 gelb	34,1	9,0	54,4	50,4	69,8	66,0	19,2	19,0
2 1/2	33,2	34,8	22,6	12,0	4,0 gelb	32,8	14,8	44,0	43,2	57,9	37,0	24	17,5
3	46,0	28,8	20,2	0(-2,5)	0 (neutral)	35,2	20,9	57,7	20,4 (gelb)	61,0	8,8	0	0

(Gesamtsäure)

freie HCl

gleiche Menge Bikarbonat wie bei den vorangehenden Versuchen, also 50cem von 10 Proz. Lösung, direkt vor dem Essen ins Duodenum durch die Duodenalpumpe eingegeben. Weil es mir leicht möglich schien, dass die Einführung der Duodenalpumpe vor dem Essen irgendwie appetitstörend und folglich auch sekretionshemmend wirkt, so habe ich in einigen Fällen als dritte Reihe von Versuchen statt Alkalilösung eine gleiche Menge (50 cem) lauwarmes Wasser duodenal zugeführt. Bei diesen Untersuchungen habe ich ab und zu bemerkt, dass der herausgeholte Magensaft wegen des Rückflusses des Duodenalinhaltes gelblich gefärbt war. Wo ich in der folgenden Tabelle in Klammern gelb geschrieben habe, handelt es sich um einen solchen Rückfluss. Im Falle, wo die freie Salzsäure negativ ausfiel, habe ich bestimmt, wie viel Zehntel Säure zu ihrer Neutralisierung nötig ist und diese Zahl ist auch in Klammern angegeben.

Aus der Tabelle VIII ersieht man, dass die Azidität des Mageninhaltes bei Versuchen mit duodenaler Wasserzufuhr im grossen und ganzen etwas niedriger auszufallen scheint als bei den Kontrollversuchen, ohne dass aber ein deutlicher Unterschied zwischen beiden beobachtet wird. In den vorliegenden Versuchen war es sehr auffallend, dass der Rückfluss des Duodenalinhaltes sehr häufig und oft ziemlich stark bald nach der Eingiessung der Alkalilösung zustande kam, so dass in einer Hälfte meiner Untersuchungsfälle die freie Salzsäure bei Versuchen mit der Alaklizufuhr durch die ganze erste Stunde bei wiederholten Untersuchungen stets negativ und sogar oft gegen Kongorot stark alkalisch gefunden wurde, was sicher auf den Rückfluss der ins Duodenum eingeführten Alkalilösung in den Magen zurückzuführen ist. Bei Versuchen, wo der Mageninhalt eine Stunde nach dem Probefrühstück nur einmal ausgehebert wurde, gehörte totaler Schwund der freien Salzsäure zu seltenen Ausnahmen. Es scheint mir also, als ob der Rückfluss der duodenal eingegebenen Alkalilösung in den Magen bei Versuchen mit den Rehfussem Apparate weit häufiger vorkommt, als bei Versuchen mit einmaliger Ausheberung. Wenn man in der anderen Hälfte meiner Untersuchungsfälle, bei denen die

Magenacidität nicht auffallend durch den Rückfluss des Duodenalinhalt beeinflusst wurde, der Befund bei den Alkaliversuchen mit dem der Kontroll- und Wasserversuche in Vergleich stellt, so beobachtet man im grossen und ganzen, dass der Säuregehalt dort etwas niedriger als hier ist. Weil der Rückfluss der Alkalilösung auch in den Fällen mit einem mässigen Säuregehalt möglich ist, wie es bei Nr. 7 der Fall ist, so ist es nicht leicht, den sekretionshemmenden Einfluss des ins Duodenum zugeführten Alkalis richtig zu beurteilen. Jedenfalls muss man nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen annehmen, dass die Magensekretion hemmende Wirkung des Alkalis vom Duodenum aus beim Menschen nicht immer so auffallend ist, wie Pimenow dies am Hunde beobachtet hat.

#### VI. EINFLUSS DER SUBKUTANEN ALKALIZUFUHR AUF DIE MAGENSEKRETION.

Weil das Natriumbikarbonat bei der Sterilisation sehr leicht durch Entweichung der Kohlensäure teilweise in Karbonat übergeht und die subkutan eingeführte Karbonatlösung heftigen Schmerz ja sogar oft Gewebnekrose verursacht, so glaubt man im allgemeinen, dass die subkutane Injektion der Bikarbonatlösung in klinischer Hinsicht, und zwar für die Behandlung der Hypersekretion, von keiner Bedeutung ist. Neulich hat S. Saito aber mitgeteilt, dass er an einem Hunde mit einem kleinen Magen experimentell nachweisen konnte, dass die Magensekretion durch subkutane Injektion von 20 ccm 5 Proz. Bikarbonatlösung bedeutend herabgesetzt wird und die hemmende Wirkung über vier Stunden fortdauert. Er schliesst daraus, dass subkutane Injektion der Bikarbonatlösung für die Behandlung der Magengeschwüre, u. z. bei Blutung, anwendbar sei. Dem kann ich mich aber nicht ohne weiteres anschliessen, weil meine Erfahrung, dass ich bei meinen Untersuchungen mit intravenöser Alkalizufuhr häufig eine sichere Hemmung der Magensekretion vermisste, mich auf den Gedanken brachte, dass die von ihm beobachtete Sekretionshemmung nicht die Folge des resorbierten Alkalis sei. Es ist eine all-

bekannte Tatsache, dass die Magensekretion bei der Nahrungsaufnahme zuerst durch psychischen Einfluss und dann durch die chemische Wirkung der Nahrungsbestandteile wie ihrer Spaltungsprodukte hervorgerufen wird. Weil die psychische Sekretion durch ein unangenehmes Gefühl wie Schmerz deutlich gehemmt wird und die subkutane Injektion von der Bikarbonatlösung sicher einen Schmerz hinterlässt, so muss man dieses Moment nicht ausser acht lassen. Um dieser Frage näher zu kommen, habe ich folgende Versuche an Hunden mit kleinem Magen ausgeführt. Hier wurden den Versuchstieren 100 g rohes Pferdfleisch nach 24-stündiger Frist gegeben und der aus dem kleinen Magen herausfliessende Magensaft halbstündlich 5 Stunden lang untersucht, indem 20 cem 5 Proz. Bikarbonatlösung einmal direkt vor der Nahrungsaufnahme und ein anderes Mal mehrere Minuten danach subkutan injiziert wurden. Diese Versuchsanordnung wurde von dem folgenden Gedankengang geleitet. Wenn die Sekretionshemmung, welche bei subkutaner Injektion der Bikarbonatlösung zustande kommt, durch das resorbierte Alkali bedingt wird, so muss das Untersuchungsergebnis unabhängig von der Injektionszeit fast gleich ausfallen, weil das subkutan eingeführte Alkali nur langsam resorbiert wird. Wenn die hemmende Wirkung dagegen wesentlich auf dem durch Bikarbonatinjektion herbeigeführten Schmerz beruht, so lässt sich daraus folgern, dass die hemmende Wirkung durch den Zeitpunkt der Injektion stärker beeinflusst werden wird. Bekanntlich wird der Magensaft bei der Nahrungsaufnahme in erster Phase durch den psychischen Einfluss und in zweiter Phase durch den chemischen Reiz abgesondert. Bei subkutaner Bikarbonatinjektion vor der Fleischaufnahme ist es sehr wohl möglich, dass die erste Phase der Magensekretion dadurch wegen des Schmerzes von Anfang an deutlich gehemmt wird, während es nicht der Fall ist, wenn die Injektion mehrere Minuten nach der Beendigung der Nahrungsaufnahme ausgeführt wird. Hier muss die psychische Sekretion schon vor der Injektion wie in der Norm kräftig aufgefangen haben und infolgedessen die erste Phase der Sekretion grösser als dort ausfallen. Es ist auch eine bekannte

## TABELLE

Versuche mit subkutaner Alkalizufuhr

Zeit der Injektion		Nach der Nahrungsaufnahme								
Versuchshund		Hund Nr. 3 (10,39 Kg.)				Hund Nr. 5 (9,49 Kg.)				
		Versuch I.		Versuch II.		Versuch I.		Versuch II.		
		Kontroll- versuch	Versuch mit Alkalizufuhr	Kontroll- versuch	Versuch mit Alkalizufuhr	Kontroll- versuch	Versuch mit Alkalizufuhr	Kontroll- versuch	Versuch mit Alkalizufuhr	
Datum		5. XII. 1922.	7. XII.	8. XII.	9. XII.	30. V. 1924.	1. VI.	3. VI.	5. VII. 8. VII.	
Menge des Magensaftes in ccm	1/2 Std. nach d. Nahrungs- aufnahme	4,3	6,5	7,4	1,0	1,4	0,8	1,7	1,5	0,3
	1	2,9	4,6	5,3	3,8	1,2	1,1	1,6	1,8	0,4
	1 $\frac{1}{4}$	4,2	2,1	2,9	3,7	1,5	1,5	2,4	0,9	1,0
	2	1,9	1,9	2,5	5,6	1,0	1,2	1,9	1,9	2,0
	2 $\frac{1}{2}$	1,0	0,8	4,9	5,7	5,7	1,6	1,8	1,4	1,7
	3	8,4	2,5	5,7	2,4	4,3	1,5	1,4	1,6	1,3
	3 $\frac{1}{2}$	3,3	4,1	4,4	6,1	1,7	1,7	1,4	0,9	2,6
	4	1,4	1,5	1,7	1,9	1,7	1,6	1,2	1,0	2,2
	4 $\frac{1}{2}$	2,5	1,4	1,6	2,1	0,7	2,7	0,8	0,8	1,3
5	1,5	2,7	1,6	0,8	1,5	1,9	1,3	0,7	1,7	
Gesamtmenge		31,4	27,9	38,0	33,1	20,7	15,6	15,5	12,5	14,5
Gesamtazidität		72,4	87,5	87,9	88,2	58,4	58,4	41,6	24,0	32,6
freie HCl		64,8	75,2	73,4	80,6	47,0	49,2	28,4	13,2	15,6

IX.

 (20 cem 5%  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung)

## Vor der Nahrungsaufnahme

Hund Nr. 3				Hund Nr. 5						
Versuch I.		Versuch II.		Versuch I.			Versuch II.			
Kontroll- versuch	Versuch mit Alkali- zufuhr	Kontroll- versuch	Versuch mit Alkali- zufuhr	Kontroll- versuch	Versuch mit Alkali- zufuhr	Kontroll- versuch	Kontroll- versuch	Versuch mit Alkali- zufuhr	Kontroll- versuch	
29. I. 1923.	30. I.	31. I.	2. II.	7. VI. 1924.	10. VI.	13. VI.	24. VI.	27. VI.	30. VI.	
Menge des Magensaftes in cem	4,1	2,4	2,1	1,3	2,4	1,0	1,2	3,6	1,8	2,5
	5,8	0,5	2,1	0,7	3,8	0,9	1,5	1,0	1,6	4,3
	5,6	1,4	2,8	0,4	3,1	1,5	2,8	1,9	2,4	2,1
	2,2	0,7	2,8	0,3	2,5	3,7	1,8	1,1	1,2	2,8
	4,2	0,3	9,4	0,5	2,2	2,2	5,4	1,1	3,4	1,5
	5,3	0,3	3,5	0,3	0,9	4,9	1,0	1,3	2,4	1,2
	4,9	0,4	3,4	0,3	0,6	2,3	1,0	1,2	1,9	0,8
	9,4	0,8	3,2	0,7	0,7	2,2	2,2	1,1	3,3	1,2
	2,1	2,6	3,3	2,9	1,3	2,0	0,6	0,9	3,6	1,5
	1,9	1,5	2,2	1,8	0,7	0,9	0,5	0,7	2,4	2,7
45,4	10,9	34,8	9,2	18,2	21,6	18,0	13,9	23,8	20,6	
89,5	47,0	85,7	31,6	70,8	55,6	60,4	31,8	47,4	41,6	
55,4	37,1	79,2	16,2	57,0	45,2	49,4	20,8	37,8	29,2	

Tatsache, dass die zweite Phase der Sekretion durch die erste deutlich beeinflusst wird, weil die Bildung der stark sekretorisch wirkenden Verdauungsprodukte von der Stärke der letzteren abhängt. Daraus folgt, dass die Absonderung des Magensaftes in solchem Falle durch den ganzen Verlauf vermindert gefunden wird. Meine Untersuchungsergebnisse sind in der Tabelle IX mitgeteilt.

Aus der Tabelle IX ersieht man, dass die nach Nahrungszufuhr vorgenommene subkutane Injektion der Bikarbonatlösung bei beiden Versuchstieren keine Hemmung auf die Magenabsonderung ausübte, während dieser Einfluss beim Hunde Nr. 3 sehr auffallend in die Erscheinung trat, als die Injektion vor der Nahrungsaufnahme ausgeführt wurde. In letzterem Falle wurde die Sekretionsmenge wie der Säuregehalt bedeutend kleiner gefunden als bei den Kontrollversuchen. Beim Hunde Nr. 5 wurde aber eine solche Erscheinung vermisst. Aus dem Grunde, den ich oben genau darlegte, muss ich bei diesem Befunde schliessen, dass die nicht immer vorkommende Sekretionshemmung, welche durch die subkutane Injektion der Bikarbonatlösung verursacht wird, nicht die Wirkung des resorbierten Alkalis ist und ein wesentliches ätiologisches Moment davon höchst wahrscheinlich das Schmerzgefühl ist. Aus dieser Erscheinung könnte man wohl den allgemeinen Schluss ziehen, dass ein psychisch sekretionshemmendes Moment einen grossen Einfluss auf die Verdauung ausüben kann, wenn es vor der Nahrungsaufnahme sich einstellt, während es beim Auftreten nach dem Essen nur von undeutlicher Wirkung ist. Zunächst scheint es mir besonders interessant, dass die Sekretionshemmung auch bei diesen Versuchen nur beim Hunde Nr. 3, wo die Magensekretion gegen Alkali empfindlich reagierte, zustande kam. Hier muss man annehmen, dass die Beeinflussbarkeit der Magensekretion durch äussere Einflüsse individuell verschieden ist.

## ZUSAMMENFASSUNG.

1) Das ins Duodenum eingeführte Alkali wirkt auch beim Menschen auf die Magenazidität herabsetzend. Seine hemmende Wirkung hängt aber von der Alkalimenge wie von der Zeit seiner Zufuhr ab. Wenn man 5 g Natriumbikarbonat als 10 proz. Lösung direkt vor der Verabreichung des Probefrühstückes ins Duodenum eingiesst und eine Stunde danach den Mageninhalt aushebert, so findet man, dass seine Azidität bei Alkaliversuchen sehr häufig und oft sehr auffallend kleiner ausfällt als bei Kontrollversuchen. Wenn die gleiche Menge Bikarbonat eine und zwei Stunden vor der Mahlzeit duodenal zugeführt wird, so beobachtet man keine deutliche Aziditätsabnahme. Auch beim Gebrauch von 2 g Alkali, selbst wenn dieses direkt vor dem Essen gegeben wird, vermisst man eine deutliche Abnahme der Magenazidität.

2) Die hier beobachtete Abnahme der Magenazidität, welche durch die duodenale Alkalizufuhr verursacht wird, beruht wesentlich auf der Herabsetzung der Magensekretion und nicht auf dem Rückfluss des alkalischen Duodenalinhaltes in den Magen. Obwohl die Regurgitation hier ab und zu vorkommt, so scheint dieses Moment nach meinen Untersuchungsergebnissen für die vorliegende Erscheinung von untergeordneter Bedeutung zu sein. Es gibt aber Fälle, bei denen ein deutlicher Rückfluss häufig nach der Alkalizufuhr beobachtet wurde. Die Neigung zum Rückfluss scheint individuell verschieden zu sein.

3) Wenn man Natriumbikarbonat am Krankenbette nicht einfach zur Neutralisierung der abgesonderten Magensäure, sondern zur Herabsetzung der Magensekretion verordnen will, so muss man das Mittel in relativ grosser Dose, auf einmal wenigstens mehrere Gramm, direkt vor der Mahlzeit verordnen. Kleinere Dosen als 2 g Bikarbonat haben keine solche Wirkung.

4) Die intravenöse Zufuhr von 5 g Natriumbikarbonat verursacht beim Menschen keine deutliche Herabsetzung der Magensekretion.

5) Das Kohlensäurebindungsvermögen des Blutplasmas wird

eine halbe Stunde nach der Mahlzeit etwas höher gefunden, als im nüchternen Zustande morgens. Wenn die Alkalireserve eine halbe Stunde nach intravenöser Injektion von 5 g Natriumbikarbonat bestimmt wird, so beobachtet man nicht immer, sondern nur ab und zu eine deutliche Zunahme der Alkalireserve. Dieser Befund beweist, dass das in die Blutbahn eingetretene überflüssige Alkali gewöhnlich in kurzer Zeit durch den Kreislauf beseitigt und wahrscheinlich in den Geweben zurückgehalten wird. Diese Steigerung des Kohlensäurebindungsvermögens geht nicht mit der Abnahme der Magenazidität parallel.

6) Bei Untersuchungen an zwei Hunden mit kleinem Magen wurde die Abnahme der Sekretionsmenge wie der Azidität des Magensaftes nach der intravenösen Alkalizufuhr nicht immer, aber oft gefunden.

7) Bei fraktionierter Untersuchung des Mageninhaltes mit dem Refluxsschem Apparate beobachtet man bei Versuchen mit duodenaler Alkalizufuhr sehr häufig den Rückfluss der Alkalilösung, was die Wirkung der Alkalilösung vom Duodenum aus auf die Magensekretion undeutlich macht. Die Resultate der Untersuchungen, bei denen der Rückfluss nicht deutlich war, zeigen, dass die die Magensekretion herabsetzende Wirkung des ins Duodenum zugeführten Alkalis beim Menschen nicht so auffallend ist, wie Pimenow am Hunde beobachtet hat.

8) Subkutane Injektion der Bikarbonatlösung verursacht oft eine deutliche Abnahme der Magensaftabsonderung, wenn die Alkalilösung vor der Verabreichung der Nahrung subkutan zugeführt wird. Wenn die Injektion aber mehrere Minuten nach der Nahrungsaufnahme ausgeführt wird, so tritt ihre hemmende Wirkung gewöhnlich nicht auf. Hier ist das Moment, welches die Magensekretion herabsetzt, nicht das resorbierte Alkali, sondern der Schmerz, welcher durch die subkutane Zufuhr der Alkalilösung verursacht wird. Bei dieser Sachlage ist es selbstverständlich, dass die subkutane Injektion der Bikarbonatlösung zum Zwecke der Verminderung der Magensekretion von keiner klinischen Bedeutung ist. Zunächst kann man in allgemeinen sagen, dass

ein psychisches sekretionshemmendes Moment einen grossen Einfluss auf die Verdauung ausübt, wenn es vor der Mahlzeit wirkt, während es beim Auftritt nach dem Essen von geringerer Wirkung ist.

9) Die Beeinflussbarkeit der Magensekretion durch äussere Einflüsse scheint individuell verschieden zu sein.

## LITERATUR.

- Kawashima, Y.: Japanische Zeitschrift f. Verdauungskr., **22**.  
Linossier u. Lemoine, (1911): zit. n. O. Wegle, Therapie d. Magen- u. Darmerkrankungen, IV. Aufl., 110.  
Lönneqvist, (1906): Skand. Archiv f. Physiologie, **43**, 232.  
Mathieu u. Hallot, zit. n. Wegle.  
Matsuyama, T. (1924): J. of Biochem., **4**, 199.  
Pimenow, P. P. (1907): Zentralbl. f. d. gesam. Physiol. Pathol. d. Stoffwechs., Nr. 12.  
Reichmann: zit. nach Wegle.  
Saito, S. (1922): Nihon no Ikai, **12**, Nr. 39.  
Sawitsch u. Zeljony (1913): Pfügers Arch. 150, 135.



# ÜBER DIE GLYKOLYTISCHE KRAFT DES BLUTES,

## III. Mitteilung.

### Untersuchungen über die Beziehung zwischen der glykolytischen Kraft und der $O_2$ -Zehrung der Erythrozyten.

VON

YOSHIKANE KAWASHIMA.

*Aus der biochemischen Abteilung des Instituts für Infektionskrankheiten  
der kaiserlichen Universität zu Tokyo.*

*Vorstand: Dr. T. Kohmoto*

(Eingegangen am 7. Juli 1924)

## I. EINLEITUNG.

In den vorherigen Mitteilungen (1922-1924) betonte ich wiederholt, dass die glykolytische Kraft der Erythrozyten in einem innigen Zusammenhang mit ihrer Lebensaktivität steht. Die vorliegenden Experimente richteten sich auf die Glykolyse und die Sauerstoffzehrung der Erythrozyten, um die Beziehung zwischen diesen beiden Vorgängen, Vitalität und Glykolyse, von dem obigen Standpunkte aus zu erörtern. Die Atmung und Gärung waren schon von mehreren Autoren, Otto Warburg (1912), A. Harden u. W. J. Young (1912) und Otto Meyerhof (1917-1918) u. a., erforscht worden. Dabei handelte es sich aber hauptsächlich um die Hefezellen oder um den Muskelsaft. Die Autoren waren der übereinstimmenden Ansicht, dass das Koferment der Gärung und der Atmungskörper ganz oder zum Teil identisch sind. Meyerhof erwähnte auch, dass das Muskel- und Hefekoferment im grossen und ganzen ähnlich seien.

Die Atmung des Blutes wurde auch von vielen Forschern, wie Otto Warburg (1909), P. Morawitz u. J. Pratt (1908), P. Morawitz (1909), S. Itami (1910) und Philip Ellinger

(1922), an Kaninchen, Hunden und Gäusen experimentell untersucht. Ausserdem führten P. Morawitz u. S. Itami (1910) und Denecke, Gerhard u. Hermann Rüberg (1922) Untersuchungen über das Menschenblut der Anämiker und Graviden aus. In diesen Experimenten war der Zweck ganz verschieden von den meinigen, weil die Untersuchungen hauptsächlich auf die atmenden Blutzellen bei den Anämien, oder auf den Einfluss gewisser Substanzen auf die Erythrozytenatmung u. s. w. gerichtet waren. Ich habe aber die Atmung der Erythrozyten mit ihrer glykolytischen Kraft vergleichend untersucht.

## II. UNTERSUCHUNGSMETHODE.

Zur Messung des Sauerstoffverbrauches wurde von den oben erwähnten Autoren meistens Haldane-Barcroft's Blutgasapparat verwendet, wozu schon eine kleine Menge Blut hinreichend ist. Weil aber die Atmung der kernlosen Erythrozyten bekanntlich nicht so gross ist, so muss besser mit einer grossen Menge Blut gearbeitet werden, um den Ausschlag des Versuchs deutlich erfolgen zu lassen. Dazu wählte ich als Versuchstier das Pferd aus. Die dreimal mit der physiologischen Kochsalzlösung ausgewaschenen Blutzellen wurden in ein entsprechendes Quantum von derselben Lösung aufgeschwemmt. Diese Aufschwemmung wurde noch mit einer gewissen Menge isotonischer Kochsalzlösung, die Traubenzucker im 10%igen Verhältnis enthielt versetzt und sie steht nun als Versuchsmaterial zur Verfügung.

Zur Untersuchung der Atmung wurde der Apparat in Anwendung gebracht, welcher von Dr. K. Kanasawa nach der Methode zur Messung der Gewebsatmung von F. Battelli und L. Stern (1910) etwas modifizierend konstruiert und beiseiner Arbeit über die Gewebsatmung im pharmakologischen Laboratorium der kaiserlichen Universität benützt wurde. Hierbei spreche ich Herrn Dr. K. Kanasawa für seine freundlichen Anweisungen und Bemerkungen bei der Anwendung des Apparates meinen besten Dank aus.

In eine ca 200 ccm fassende Flasche mit einem gut eingeschliffenen, und zweckmässig geformten Glasstopfen wurden 50

cem der oben erwähnten Blutkörperchenaufschwemmung luftdicht eingebracht und die frische, mit Watte keimfrei filtrierte Aussenluft genügend eingeleitet. Ein Versuch bestand immer aus drei von den so unter gleichen Bedingungen bereiteten und gleiches Volumen Blut enthaltenden Flaschen, von denen zwei in den Brutschrank hineingestellt wurden, und von denen die eine zur Gasanalyse (Messung der Blutzellenatmung), die andere zur Bestimmung der Zuckerabnahme diente; die dritte Flasche wurde als Kontrollprobe zur Gasanalyse der ersten Flasche in der Eiskammer aufbewahrt, worin die Blutzellen keine Atmung—keinen Sauerstoffverbrauch—zeigten.

Für die Gasanalyse wurde das Prinzip von Zuntz-Geppert aufgenommen: Die gebildete Kohlensäure wurde von der Absorptionsmethode mit einer konzentrierten NatronlaugeLösung und der Sauerstoff nach der Verbrennungsmethode mit Phosphorstange volumetrisch gemessen. Der erhaltene Wert der Kohlensäurezunahme und Sauerstoffabnahme wurde immer mit 2 multipliziert, d. h. auf 100 cem Blut berechnet, und dann bei 0°C und 760 mm Druck reduziert. Zur Zuckerbestimmung bediente ich mich ebenfalls des Mikroverfahrens von Bang.

Anfangs wurden die Proben auf einen Schüttelapparat im Brutschrank gebracht und während einer Versuchsdauer leise geschüttelt. Da aber die Erythrozyten dabei mechanische Schädigung erlitten und so ihre glykolytische Kraft und Atmung beeinträchtigt waren, wie die nachstehende Erklärung zeigt, so wurden später die Flaschen ab und zu, 1–2 stündlich, mit der Hand umgeschüttelt.

Wegen der komplizierten und ziemlich langen Behandlung der Probe bei diesen Experimenten habe ich besondere Sorgfalt auf Bakterienfreiheit verwendet, welche durch aerobe und anaerobe Kultur sichergestellt wurde.

TABELLE I.

No.	Versuchs- dauer in St. u. Temp. (C)	Zuckergehalt in %		Zucker- abnahme in mg u. (%)	O <sub>2</sub> - Zehrung zu 100 cem Blut (in cem)	CO <sub>2</sub> - Bildung	Zahl d. Erythr., Millionen	Zahlen zu $1 \times 10^5$ Mill. Erythrocyten	
		vor dem Versuch	nach d. Versuch					Zucker- abnahme in mg.	aufge- zehrt O <sub>2</sub> in cem
1. ....	3(38°) 6, " 13, " 18, "	0,275 0,275 0,275 0,275	0,271 0,254 0,239 0,222	4(15) 21(7,6) 36(13,1) 53(19,3)	0,8 0,6 2,6 3,3	0,4 0,4 2,1 3,4	6,728 " " "	0,6 3,1 5,4 7,9	0,1 0,1 0,4 0,5
2. ....	21(40°)	0,267	0,219	48(18,0)	3,2	2,0	9,667	5,0	0,3
3. (*)	24(38°)	0,279	0,243	36(12,9)	1,8	0,6	6,616	5,4	0,3
4. ....	24, "	0,313	0,263	50(16,0)	2,6	1,4	7,872	6,4	0,3
5. (†)	21, "	0,274	0,228	46(16,8)	1,6	0,8	6,928	6,6	0,2
6. ....	21(37°)	0,267	0,209	58(21,7)	3,6	2,0	8,491	6,8	0,4
7. ....	24(40°)	0,266	0,208	58(21,8)	5,4	1,8	8,138	7,1	0,7
8. (†)	24(38°)	0,267	0,201	66(24,7)	4,0	0,8	8,904	7,4	0,4
9. ....	21, "	0,287	0,228	59(20,6)	3,2	0,2	7,112	8,3	0,5
10. ....	24(40°)	0,300	0,209	91(30,3)	7,2	4,0	9,808	9,3	0,7
11. ....	24(38°)	0,234	0,152	82(35,0)	6,4	3,0	8,592	9,5	0,7
12. (*)	21, "	0,279	0,202	77(27,6)	4,2	1,6	7,984	9,6	0,5
13. ....	24, "	0,192	0,113	79(41,1)	3,0	0,8	6,864	11,5	0,4
Durchschnitt								7,9	0,5

No. 10 u. 2 = Vor der Anstellung zur Untersuchung wurden sie ohne Zuckerzusatz einen Tag lang in der Eiskammer aufbewahrt.

† No. 5 u. 8 = Während des Versuches war die Temperatur der Brutschrankes mehrere Stunden lang auf 33° u. 35° C heruntorgegangen.

\* Bei No. 3 u. 12 wurde die H-Ionenkonzentration vor und nach dem Versuch gemessen.

### III. ERGEBNISSE DER EXPERIMENTE.

#### 1. Die Glykolyse und Atmung der Pferdebluterythrozyten.

Wie schon in der Einleitung hervorgehoben, haben die früheren Autoren an Kaninchen, Hunden und Menschen nachgewiesen, dass die kernlosen Erythrozyten, u. z. die jungen bei einer gesteigerten Regeneration, eine deutlich messbare Atmung (Sauerstoffzehrung) aufweisen. Hier mögten zuerst die Ergebnisse meiner Experimente mit Pferdeblut aufgezeichnet werden.

Wie die Tabelle I zeigt, ist auch an den in der physiologischen Kochsalzlösung aufgeschwemmten Erythrozyten des Pferdes in gut nachweisbarer Sauerstoffverbrauch nach 24 Stunden in  $38^{\circ}$ – $40^{\circ}\text{C}$ , meistens  $38^{\circ}\text{C}$ , zu bestätigen, der aber in den ersten Stunden ziemlich klein ist, wie aus dem Versuch No. 1 ersichtlich ist. Doch zeigt er einen relativ grösseren Wert im Verhältnis zum weiteren Verlaufe, worüber der Verfasser beim Versuche mit dem Vollblut wieder sprechen will.

Die gebrauchte Sauerstoffmenge nach dem Versuch beträgt  $0,3$ – $0,7 \times 10^{-5}$  ccm, durchschnittlich  $0,5 \times 10^{-5}$  ccm auf Mill. Erythrozyten ( $2,4$ – $5,6$  ccm, durchschnittlich  $4,0$  ccm zu  $100$  ccm Blut, dessen Erythrozytenzahl als  $8$  Millionen in  $1$  cmm angenommen ist). Eine noch grössere Schwankung der gemessenen  $\text{CO}_2$ -Menge mag vielleicht auf der Verschiedenheit des Oxydationsgrades beruhen. Die gespaltene Zuckermenge zu  $1$  Mill. Erythrozyten ist  $5$ – $11,5 \times 10^{-5}$  mg, durchschnittlich  $7,9 \times 10^{-5}$  mg. ( $40$ – $92$  mg, durchschnittlich  $63,2$  mg. zu  $100$  Blut mit  $8$  Millionen Erythrozytenzahl in  $1$  cmm). Vorausgesetzt, dass der Traubenzucker nach der Formel— $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2 = 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$ —verbraunt, so ist die gefundene Sauerstoffmenge viel zu klein, höchstens  $1/8$ – $1/20$  der berechneten. Kurz, ein (bestimmter) Zusammenhang zwischen der gespaltenen Zuckermenge und dem gebrauchten Sauerstoff besteht nicht. Aber von einigen Fällen abgesehen, geht die Stärke der glykolytischen Kraft im grossen und ganzen parallel mit der Grösse des  $\text{O}_2$ -Verbrauches.

Bei nur zwei Fällen, No. 3 u. 12, wurde die  $H^+$ -Konzentration vor und nach dem Versuch gemessen, beim ersteren  $pH=7,06-6,76$ , beim letzteren  $pH=7,02-6,68$ . Bei einem anderen Fall, wo als Medium das Phosphatgemisch benützt wurde, waren 93 mg Zucker gespalten und 29,8 ccm Sauerstoff verbraucht; der  $pH$ -Wert war vor dem Versuch  $pH=7,49$  und am Ende  $pH=7,42$ .  $pH$  bleibt also bei dem mit Puffer versetzten Fall fast unverändert. Ich möchte hier beifügend erwähnen, dass eine Säurebildung bei der Glykolyse der Erythrozyten stattfindet. Diesbezüglich ist eine weitere Untersuchung notwendig.

## 2. *Die Glykolyse und Atmung der veralteten Erythrozyten.*

Wie aus meiner ersten Mitteilung (1922) ersichtlich ist, so wirkt die einen Tag lang im Brutschrank gelassene Blutkörperchenaufschwemmung des Kaninchens nicht mehr oder nur spurweise glykolytisch. In diesem Kapitel handelt es sich um die Atmung von solchen Blutkörperchen. Man nahm eine Blutkörperchenaufschwemmung von Pferdes mehr als 300 ccm zur Untersuchung, stellte eine Hälfte in den Brutschrank und die andere als Kontrolle in die Eiskammer ein. Nach 24-stündigem Verlaufe wurden sie nun mit der Zuckerlösung versetzt, und die Glykolyse mit der Atmung parallel untersucht. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle II zusammengestellt.

Aus der Tabelle II kann man sehen, dass die Atmung der Erythrozyten mit der glykolytischen Kraft fast parallel verloren geht, während die in der Eiskammer aufbewahrten Erythrozyten stark glykolytisch und  $O_2$ -verzehrend wie das frische Blut wirken. In dem Fall V, der nach 24 stündigem Stehenbleiben in  $38^\circ C$  noch eine ziemlich starke glykolytische Kraft beibehalten hat, kann man auch wieder einen deutlichen Sauerstoffverbrauch bestätigen. Die Frage aber bleibt noch unentschieden, welche von den beiden, d. h. Atmung oder Glykolyse, früher als die andere verschwindet. Damit beschäftigen sich die nächsten Versuche.

TABELLE II.

No.	Versuchsdauer in St. u. Temp. (°C)	Zuckergehalt in %		Zucker- abnahme in mg u. (%)	O <sub>2</sub> -Zeh- rung zu 100 cem Blut (in cem)	CO <sub>2</sub> -Bil- dung zu 100 cem Blut (in cem)	Zahl der Erythr., Millionen	Zahlen zu 1 × 10 <sup>5</sup> Mill. Erythrozyten	
		vor dem Versuch	nach dem Versuch					Zucker- abnahme in mg	Aufge- zehrer O <sub>2</sub> in cem
I { a b	24(40°)	0,294	0,284	10(3,4)	1,6	0	9,408	1,1	0,2
	" ( " )	0,307	0,209	91(30,3)	7,2	4,0	9,808	9,3	0,7
II { a b	24(40°)	0,261	0,266	0	0	0	8,608	0	0
	" ( " )	0,267	0,219	48(18,0)	3,2	2,0	9,667	5,0	0,3
III	24(39°)	0,266	0,280	0	0	0	10,325	0	0
IV	24(39°)	0,263	0,269	0	0,6	0	8,279	0	0,1
V	24(38°)	0,252	0,222	30(11,9)	3,0	1,4	11,689	2,6	0,3

No. Ia u. II a = Vorher 24 Stunden lang im Brutschrank von 40° C ohne Zuckerzusatz aufbewahrt und dann mit Zuckerlösung versetzt, dann wieder einen Tag in demselben Brutschrank gestanden.

No. Ib u. II b = Als Kontrollen zu a wurden sie vorher einen Tag in der Eiskammer aufbewahrt und gleich-  
zeitig mit a nach dem Zuckerzusatz zur Untersuchung angestellt.

No. III u. IV = wurden vorher 24 Stunden lang in den Brutschrank von 39° C gestellt, ohne mit Zuckerlösung  
versetzt zu werden, dann zur Probe angestellt.

No. V = Ebenfalls vorher einen Tag lang in 38° C gelassen.

TABELLE III.

No.	Verhaltensdauer in St. u. Temp. (C)	Zuckergehalt in %		Zuckerabnahme in mg. u. (%)	O <sub>2</sub> -Zeh- rung	CO <sub>2</sub> -Bil- dung	Zahl d. Erythr., Million	Zahlen zu 1 × 10 <sup>5</sup> Mill. Erythrozyten	
		vor dem Versuch	nach dem Versuch					Zucker- abnahme in mg.	Aufge- zählter O <sub>2</sub> in cem
		zu 100 cem Blut (in cem)							
I. 6 St.	6(38°)	0,244	0,199	45(18,4)	6,4	3,2	9,593	4,7	0,7
II. 18 St.	18(38°)	0,242	0,192	50(20,6)	4,0	2,5	10,960	4,6	0,4
III. 18 St.	18(38°)	0,243	0,197	46(18,9)	3,6	1,0	10,496	4,4	0,3
IV. 28 St.	28(38°)	0,266	0,252	14(5,3)	1,2	1,0	9,737	1,4	0,1

Die Dauer der Glykolyse und Atmung war 24 Stunden und die Temperatur 38°C.

Wie die Tabelle zeigt, halten sich die beiden Vorgänge—Glykolyse und Atmung—auch bei einem vorläufigen Aufenthalt im Brutschrank kürzeren oder längeren als 24 Stunden—parallel. Mit anderen Worten, solange die Erythrozyten noch ihre glykolytische Kraft beibehalten, zeigen sie auch einen Sauerstoffverbrauch, und umgekehrt.

### 3. Glykolyse und Atmung der durch Frieren und Auftauen hämolysierten Blutkörperchenaufschwemmung.

Otto Warburg (1911, 1921) hat an den Vogelblutzellen nachgewiesen, dass ihre Atmung durch das Gefrieren nicht vernichtet wird, und dabei die gesamte Atmung an die festen Zellbestandteile gebunden ist. Er hat noch hinzugefügt, dass der Kern dadurch nicht so verändert sei. Von ihm wurde an den stark atmenden Vogelblutzellen auch schon festgestellt, dass sie nicht mehr atmen, wenn sie mechanisch—mit Sand oder auch ohne

TABELLE IV.

No.	Versuchs- dauer in St. u. Temp. (°C)	Zuckergehalt in %		Zucker- abnah- me in mg. u. (%)	O <sub>2</sub> -Zehrung		Zahl der Erythr., Million.	Zahlen zu 1×10 <sup>5</sup> Mill. Erythrozyten	
		Vor dem Versuch	Nach dem Versuch		zu 100 ccm Blut (in ccm)	CO <sub>2</sub> -Bil- dung		Zuckerab- nahme in mg.	Aufgezehrt. O <sub>2</sub> in ccm
I. (hämolysiert)	24(38°)	0,430	0,428	0	0,6	0	1,820		
II. { A B	24(38°)	0,369	0,382	0	0	0	1,104		
	" ( " )	0,355	0,333	22(6,2)	1,3	0,3	4,296	5,1	0,3
III. { A B	24(38°)	0,256	0,191	65(25,4)	3,8	1,3	1,264	51,4	3,0
	" ( " )	0,245	0,196	49(20,0)	2,4	1,4	8,312	5,9	0,3
IV. { A B	24(38°)	0,213	0,205	8(3,8)	0,4	0,1	0,0048	10,7	0,3
	" ( " )	0,211	0,122	89(42,2)	2,8	1,5	8,328		

A=hämolysiert.

B=nicht hämolysiert.

Bei No. I u. II A wurden volle 2 Tage für das Hämolysierungsverfahren in Anspruch genommen. Vor demselben wurde der ausgewaschene Blutkörperchenbrei mit destilliertem Wasser bis zum 2 fachen Volumen eigentlichen Blutmenge gefüllt, um schnell und vollständig hämolysiert zu werden. Nach der Hämolysse wurde konzentrierte Kochsalzlösung hinzugefügt, um die Probe isotonisch zu erhalten, wobei stark dunkelrote hämolysierte Farbe sich wieder in eine mehr hellrote veränderte.

No. II B=ebenso wie I u. II A wurden die Blutkörperchen in der physiologischen (Kochsalzlösung von 2 fachen Volumen aufgeschwemmt und als Kontrolle 2 Tage lang in der Eiskammer aufbewahrt. Bei diesen 3 Versuchen wurden 100 ccm Blut für jede Probe verwendet.

No. III A=Die Blutkörperchenaufschwemmung wurde ohne eine vorangehende Wasserrzufuhr hämo-lysiert und für das Hämolysierungsverfahren volle 5 Tage gebraucht.

No. III B=Als Kontrolle 5 Tage in der Eiskammer aufbewahrt.

No. IV A=Wie No. III A behandelt. Zur Hämolysse waren volle 3 Tage nötig. Nach der Hämolysse war eine noch gut geförnte rote Zelle ganz vereinzelte zu mikroskopieren. Bei diesem Fall No. IV war die Temperatur des Brutschranks am nächsten Morgen des Versuches auf 33° C niedergegangen.

Zusatz irgendwelcher Substanzen—zerrieben werden. Andererseits haben auch P. Rona u. K. Grassheim (1922) bewiesen, dass das dreimal wiederholte Erfrieren und Auftauen die Atmung der Hefezellen nur wenig schädigend beeinflusst. Hier habe ich ähnliche Versuche mit kernlosen Pferdeerythrozyten vorgenommen.

Nach meiner Erfahrung war es beim Pferdeblute im allgemeinen schwerer als bei Kaninchenblut, eine vollständige Hämolyse durch wiederholtes Frieren und Auftauen herbeizuführen. Bei No. I u. II A, die mit Wasser vorbehandelt wurden, blieben die zahlreichen Erythrozyten noch anscheinend ungeschädigt. Da aber diese äusserlich noch gut geformten Zellen wahrscheinlich durch das Hämolisierungsverfahren schon funktionell geschädigt waren, so wirkten sie nicht mehr glykolytisch und zeigten auch keinen Sauerstoffverbrauch. Bei No. IV A, wobei nur eine geringe Anzahl Erythrozyten vom Zerfall verschont geblieben waren, fielen die beiden Vorgänge auch negativ aus. No. III A, wobei die Hämolyse selbst nach oft wiederholtem Hämolisierungsverfahren nicht vollständig war, und zwar eine ziemlich deutliche Glykolyse in Erscheinung trat, liess auch einen deutlichen Sauerstoffverbrauch nachweisen. Die gespaltene Zuckermenge zu 1 Mill. Erythrozyten war dabei etwa 10-mal so gross wie die Kontrolle B und die gebrauchte Sauerstoffmenge auch von ganz gleichem Zahlenverhältnis. Dass die Blutkörperchen, in einem relativ grösseren Quantum von Medium aufgeschwemmt, eine stärkere Glykolyse zeigen, wurde schon in meiner zweiten Mitteilung erwähnt. Jedenfalls kann man sicher schliessen, dass die glykolytische Kraft und die Atmung der Erythrozyten in einem bestimmten Zusammenhang parallel gehen (siehe nachstehende Fig.).

#### 4. Versuche mit Vollblut.

Wie aus der Tabelle V ersichtlich ist, zeigt der Sauerstoffverbrauch des Vollblutes einen etwas grösseren Wert, aber keinen merklichen Unterschied von den Erythrozyten in der physiologischen Kochsalzlösung, während eine viel stärkere Glykolyse beim Vollblute sich erkennen lässt, wie aus den Versuchen No. III u. IV

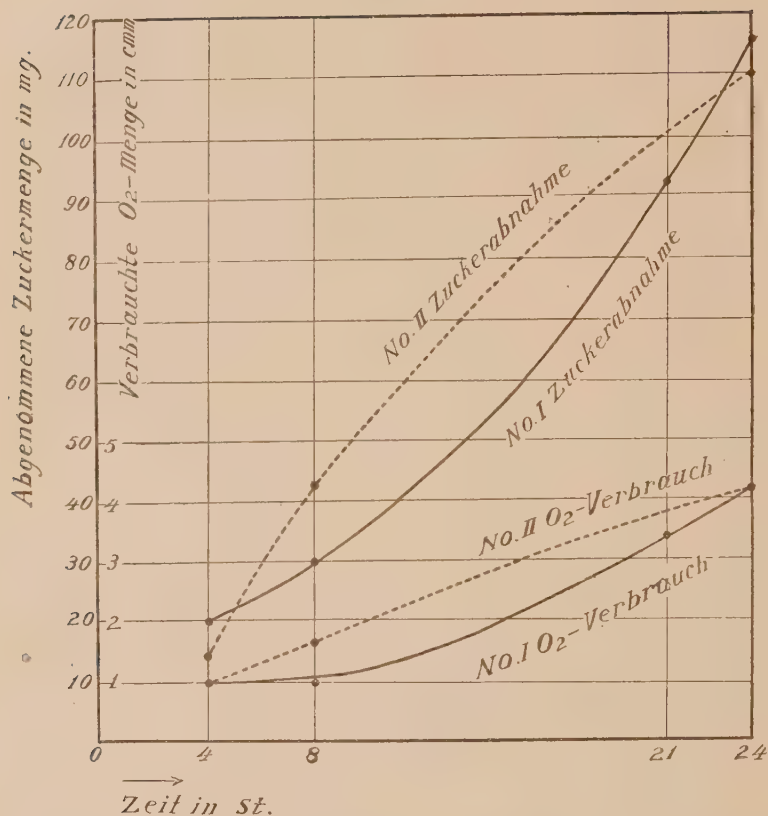
TABELLE V.

No.	Versuchs- dauer in St. Temp. (C)	Zuckergehalt in %		Zucker- aufnahme (%)	O <sub>2</sub> -Zeh- rung zu 100 cem Blut (in cem)	CO <sub>2</sub> -Bil- dung (in cem)	Zahl d. Erythr. Million.	Zahlen zu 1 × 10 <sup>5</sup> Mill. Erythrozyten	
		Vor dem Versuch	Nach dem Versuch					Zuckerab- nahme in mg	Aufgezehrter O <sub>2</sub> in cem
I. Vollblut + Zucker	4(38°)	0,234	0,214	20(8,5)	1,0	3,2	7,856	2,5	0,1
	8( " )	0,234	0,205	29(12,4)	0,8	0,2	"	3,7	0,1
	21( " )	0,234	0,141	93(39,7)	3,4	4,4	"	11,8	0,4
	24( " )	0,234	0,117	117(50,0)	4,2	7,4	"	14,9	0,5
II. Vollblut + Zucker	4(39°)	0,248	0,234	14(5,6)	1,0	1,6	7,576	1,8	0,1
	8( " )	0,248	0,205	43(17,3)	1,6	1,6	"	5,7	0,2
	24( " )	0,243	0,137	111(44,8)	4,2	8,0	"	14,7	0,6
	24(38°)	0,194	0,056	138(71,1)	7,4	12,8	8,461	16,3	0,9
III. { <sup>a*</sup> b <sup>x</sup>	" ( " )	0,234	0,152	82(35,0)	6,4	3,0	8,592	9,5	0,7
IV. { <sup>a*</sup> b <sup>x</sup>	24(38°)	0,235	0,107	128(54,5)	3,6	3,0	7,624	16,8	0,5
	" ( " )	0,192	0,113	79(41,1)	3,0	0,8	6,864	11,5	0,4

\* = Serum als Medium.

x = Physiologische Kochsalzlösung als Medium.

Fig. 1



zu ersehen ist. Wie No. I u. II zeigen, ist der aufgezehrte Sauerstoff in den ersten Stunden auch nicht so gross im Verhältnis zur Blutkörperchenaufschwemmung. Die gespaltene Zuckermenge steht dabei auch im gleichen Verhältnis zu dem Sauerstoffverbrauch (s. auch die Figur).

F. Battelli u. L. Stern (1903 u. 1910) erwähnen bei ihren Studien über die Gewebsatmung, dass das Serum einen inhibitorischen Einfluss auf die Zellatmung ausübt. Die Ursache des zur gespaltenen Zuckermenge relativ geringeren Sauerstoffverbrauchs bei meinem Versuche liegt wahrscheinlich in dieser hemmenden Wirkung des Serums.

5. *Einfluss des Phosphatpuffers auf die glykolytische Kraft und die Atmung der Erythrozyten.*

Ein begünstigender Einfluss des Phosphatpuffers auf die glykolytische Kraft der Erythrozyten wurde schon von einigen Autoren und auch von mir nachgewiesen. F. Battelli u. L. Stern (1909) haben gezeigt, dass chlórsäure, phosphorsaure und kohlénsäure Salze fast keinen Einfluss auf die akzessorische Atmung der Gewebe ausüben. Dagegen legen P. György (1922) und W. Ryffel (1923) dem Phosphat-ion, besonders in einer dünnen Konzentration, eine steigernde Beeinflussung der Zellatmung bei. P. Rona u. K. Grassheim (1922) sehen auch eine erhöhende Wirkung des Phosphats auf die Hefezellenatmung.

Bei diesem Experimente wurden die ausgewaschenen Blutkörperchen in einem Gemisch von 2 Teilen Pufferlösung und 1 Teil physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, dessen pH = 7,41 gemessen wurde. Die Pufferlösung bestand aus m/7 primärer und sekundärer Natriumphosphatlösung (Kahlbaum) im Verhältnis  $1:8 \left( \frac{Na_1 - 1}{Na_2 - 8} \right)$ .

Wie auf der Tabelle VI veranschaulicht ist, ist durch Zugabe des Puffers die Glykolyse über 2-mal grösser und dementsprechend auch der Sauerstoffverbrauch erhöht. Wenn auch die gebrauchte Sauerstoffmenge beim Fall No. I innerhalb der normalen Schwankungen der Blutkörperchen in der physiologischen Kochsalzlösung liegt, so ist sie doch 2-fach grösser als die der gleichzeitig angestellten Kontrollprobe. Diese günstige Wirkung des Phosphatgemisches kann nicht auf seiner spezifischen Ionenwirkung beruhen, sondern muss höchstwahrscheinlich dadurch bedingt sein, dass der Puffer auf die Spaltungsprodukte des Zuckers neutralisierend wirkt und die Aktivität der Zellen lang ungeschädigt erhalten lässt, weil seine aktivierende Wirkung in den ersten 5 Stunden nicht bedeutend ist und erst in den folgenden Stunden allmählich deutlich auftritt, wie aus dem Fall III a verständlich ist (siehe auch Tabelle I u. V).

TABELLE VI.

Versuchs- dauer in St. u. Temp. (°C)	Zuckergehalt in %		Zucker- abnahme in mg. u. (%)	O <sub>2</sub> -Zeh- nung zu 100 cem Blut (in cem)	CO <sub>2</sub> - Bildung zu 100 cem Blut (in cem)	Zahl d. Erythr., Million.	Zahlen zu 1 × 10 <sup>5</sup>		
	Vor dem Versuch	Nach d. Versuch					Zucker- abnahme in mg	Aufge- zehrt. O <sub>2</sub> in cem	
I. Kontrolle (NaCl) Versuch mit Phosphatgemisch	24(37°)	0,274 0,288	0,228 0,184	46(168,) 104(36,1)	1,6 3,2	0,8 0,8	6,928 6,736	6,6 15,4	0,2 0,5
	24(38°)	0,287	0,228	59(20,6)	3,2	0,2	7,112	8,3	0,5
II. a. Kontrolle (NaCl) b. Idem (ohne Zuckerzusatz) c. Versuch mit Phosphatgemisch d. Idem (ohne Zuckerzusatz)	"	0,276	0,143	133(48,2)	2,2 11,2	0,2 1,8	7,288 7,200	18,5	0,3 1,6
	"				1,8	0,2	7,330		0,2
III. a. Versuch mit Phosphatgemisch b. Idem (ohne Zuckerzusatz)	5(38°)	0,294	0,269	25(8,5)	1,0	0,2	8,088	3,1	0,1
	24( " )	0,294	0,170	124(42,2)	18,8	8,4	" (±)	15,3	2,3
	5( " ) 24( " )				0,4 0	0,8 0,4	9,088 (8,736) 3,9% nach 5 St. (8,134) 10,5% nach 24 Stunden		0,04

Fall I = Während des Versuchs war die Temperatur des Brutschranks auf 33° C niedergegangen.

Fall II b u. d = Ihre Farbe veränderte sich am nächsten Morgen des Versuches, nach 15 Stunden im Brutschrank, in dunkelrot, während die Proben a u. c dabei noch eine hellrote Farbe wie anfangs zeigten.

Fall III a = Nach 5 Stunden im Brutschrank war keine besondere Farbenveränderung im Vergleich mit der Kontrollprobe in der Eisammer zu erkennen; erst am Ende des Versuchs war die Probe von einer dunkelroten Farbe.

Fall III b = Nach 5 Stunden im Brutschrank ebenso hellrot wie a; nach 15 Stunden beobachtet, zeigte er schon eine dunkelrote Farbe.

Die Erythrocytenzahl in den Klemmern wurde am Ende der Prüfung berechnet, und die Prozentzahl zeigt eine verminderte Proportion der Erythrocyten, welche während der Versuchsdauer zu Grunde gingen.

(±) = Kein Zahlenunterschied vor und nach dem Versuch.

Bei den Fällen II b u. d, und III b, die nicht mit der Zuckerlösung versetzt wurden, war der Sauerstoffverbrauch im allgemeinen kleiner als die Proben mit Zuckerzusatz. Und dabei werden die Blutkörperchen frühzeitig dunkelrot und neigen mehr zum Zerfall. Dies ist natürlich dadurch zu erklären, dass der Zucker als Nährstoff für die Erythrozyten dient.

Hier möchte der Verfasser den Einfluss des Schüttelns—eines mechanischen Reizes—auf die Glykolyse und die Atmung der Erythrozyten untersuchen, was schon im Kapitel der Untersuchungsmethode berührt wurde.

TABELLE VII.

Fall	Versuchsdauer in St. u. Temp. (°C)	Zuckergehalt in %		Zuckerabnahme in mg. u. (%)	O <sub>2</sub> -Zehrung	CO <sub>2</sub> -Bildung	Zahl d. Erythr., Million	Zahlen zu 1 × 10 <sup>5</sup> Mill. Erythrozyten	
		Vor dem Versuch	nach d. Versuch					Zucker- abnahme in mg.	Aufgezehrt. O <sub>2</sub> in cem
		zu 100 cem Blut (in cem)							
A.	24(37°)	0,267	0,209	58 (21,7)	3,6	2,0	8,491 (±)	6,8	0,4
B.	„ ( „ )	0,275	0,232	43 (15,6)	1,6	0,4	10,526 (9,788) 7%	4,1	0,2
C. (ohne Zucker- zusatz)	„ ( „ )				0,4	0,2	10,319		0,04

Fall A=mit der Hand zeitweise umgeschüttelt.

Fall B u. C=auf dem Schüttelapparat dauernd geschüttelt.

Wie die Tabelle VII zeigt, zerfielen die Blutkörperchen in der mit einem bestimmten Apparat dauernd geschüttelten Probe deutlich und ihre Glykolyse und Atmung waren auch niedriger als die in der mit der Hand zeitweise geschüttelte Probe. Daraus kann man schliessen, dass die Atmung der Erythrozyten auch mit ihrem mechanischen Zerfall verschwindet, wie die Glykolyse.

Es ist schon bekannt, dass die Leukozyten auch einen gut messbaren Sauerstoffverbrauch zeigen. Nach Itami's Experimenten (1910) aber üben die kernhaltigen Elemente, wenn sie nicht in sehr grosser Zahl vorhanden sind, keinen intensiven Einfluss auf die Sauerstoffzehrung der Erythrozyten aus. Nach ihm zehren die Leukozyten auch wenig Sauerstoff auf, weil sie nur in einer verhältnismässig geringeren Zahl im Blut vorhanden sind. Da bei meinen Experimenten stets defibriniertes Blut verwendet wurde, waren die Leukozyten durch die verschiedenen Manipulationen meistens verschwunden und zählten nur noch 1700-7400 (durchschnittlich 3500). Dass eine so geringe Anzahl Leukozyten kaum die Ergebnisse der Experimente beeinflussen kann, ist aus den Experimenten des genannten Autors leicht verständlich.

#### 6. Versuch mit Kaninchenblut.

Es ist schon erwähnt, dass die Atmungsgrösse der Erythrozyten im grossen und ganzen mit der Stärke ihrer glykolytischen Kraft parallel geht. Zur weiteren Bestätigung dieses Ergebnisses wurden Kaninchenerythrozyten verwendet, welche etwa 2-mal grössere glykolytische Kraft enthalten als die Pferdeerythrozyten. Einige Kaninchen wurden gleichzeitig aus der Carotis verblutet und das entnommene Blut bald defibriniert, um dreimal mit der physiologischen Kochsalzlösung ausgewaschen zu werden. Die ausgewaschenen Blutkörperchen wurden wieder in derselben Lösung aufgeschwemmt und mit Zuckerlösung versetzt, dann zur Untersuchung angestellt.

TABELLE VIII.

N.	Versuchsdauer in St. u. Temp. (C)	Zuckergehalt in %		Zucker- abnahme in mg. u. (%)	O <sub>2</sub> - Zeh- rung	CO <sub>2</sub> - Bil- dung	Zahl der Erythr., Mill.	Zahl der Leukozyt.	Zahlen zu 1 × 10 <sup>5</sup> Mill Erythrozyten	
		Vor dem Versuch	nach dem Versuch		zu 100 cem Blut (in cem)				Zucker- abnah- me in mg	Aufge- zehrt. O <sub>2</sub> in cem
I.	24(38°)	0,247	0,147	100(40,5)	12,0	8,0	5,464	1700	18,3	2,2
II.	24(38°)	0,240	0,130	110(45,8)	17,2	14,2	5,496	700	20,0	3,1

Die gespaltene Zuckermenge war fast gleich der der Pferdeerythrozyten im Phosphatpuffer, der gebrauchte Sauerstoff und die gebildete Kohlensäure waren auch von einer entsprechend grossen Menge. Die Menge des aufgezehrten Sauerstoffs erreicht nur  $1/5$ — $1/6$  der Sauerstoffmenge, die nötig wäre, wenn die gespaltete Zuckermenge vollständig bis  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  verbrannt würde.

Aus den oben erwähnten Experimenten kommt man auf den Schluss, dass die glykolytische Kraft der Erythrozyten mit ihrer Atmung in einem innigen Zusammenhang steht. Die beiden Vorgänge sind nichts anders als die Lebensäusserung der Zellen. Wenn die Zellen nicht mehr imstande sind den Sauerstoff aufzunehmen, so ist die Glykolyse auch nicht nachzuweisen.

#### IV. SCHLUSSFOLGERUNGEN.

1. Pferdeerythrozyten, aufgeschwemmt in der physiologischen Kochsalzlösung, zeigen einen messbaren Sauerstoffverbrauch nach 24 Stunden in  $38^\circ\text{C}$ . Bei der Zugabe von Phosphatgemisch vergrössern sich die Atmung und die Glykolyse deutlich. Bei Kaninchenerythrozyten sind diese beiden Vorgänge viel grösser als bei den Pferdeerythrozyten.

2. Die Stärke der glykolytischen Kraft der Erythrozyten geht im grossen und ganzen mit der Grösse ihrer Atmung—Sauerstoffverbrauch—parallel. Beim Vollblute übt das Serum eine gewisse herabsetzende Wirkung auf die Atmung aus.

3. Die Dauer der Glykolyse und der Atmung stehen auch in einem parallelen Verhältnis; wenn die Erythrozyten einmal atem-inaktiv—durch Zerfall mit Frieren und Auftauen oder nach Belassen der Blutkörperchenaufschwemmung für eine gewisse Zeit im Brutschrank—werden, so kommt auch ihre glykolytische Kraft zum Verschwinden.

4. Die glykolytische Kraft der Erythrozyten ist mit ihrer Atmungsaktivität eng verknüpft. Aber diese beiden Vorgänge sind die Äusserungen von zwei differenten Phänomenen der Zellfunktion.

5. Die Blutkörperchenaufschwemmung, die mit keinem Zucker

versetzt wurde, wird frühzeitiger dunkelfarbig und enthält mehr zerfallene Erythrozyten als solche mit einer Zuckerbeigabe. Ihre Atmung ist auch kleiner als die letztere.

Zum Schlusse erlaube ich mir, Herrn Prof. Dr. M. Nagayo, Direktor des Instituts, Herrn Prof. Dr. H. Hayashi für seine beständige, freundliche Anregung und Leitung bei dieser Arbeit, und Herrn Dr. Z. Hatta und Herrn Dr. T. Kohmoto für ihre guten Ratschläge meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

#### LITERATUR.

- Battelli u. Stern (1909): *Biochem. Z.*, **21**, 487.  
 Battelli u. Stern (1910): *Cit.*, Abderhalden's Handbuch d. biochem. Arbeitsmethod., Bd. III, Heft I, 460. *Ibid.* Bd. VIII, 16 (1915).  
 Denecke, Gerhard u. Hermann Rüberg (1922): *Klin. Woch.*, **1**, 947.  
 Ellinger, P. (1922): *Zft. f. Physiol. chem.* **119**, 11.  
 Gyögy P. (1922): *Klin. Wochenschr.*, **1**, 172.  
 Harden A. u. Youn W. J. (1912): *Biochem. Z.*, **40**, 458.  
 Itami S. (1910): *Arch. f. experim. Pathol. u. Pharm.*, **62**, 93.  
 Kawashima Y. (1922): *Jl. of Biochem.*, **2**, 131.  
 Kawashima Y. (1924): *Jl. of Biochem.*, **3**, 273.  
 Morawitz P. u. Pratt J. (1908): *Münch. med. Wochenschr.*, **55**, 1817.  
 Morawitz P. (1909): *Arch. f. experim. Pathol. u. Pharm.*, **60**, 298.  
 Morawitz P. u. Itami S. (1910): *Deutsch. Arch. f. klin. Med.*, **100**, 191.  
 Meyerhof O. (1917): *Pflüger. Arch.*, **159**, 87.  
 Meyerhof O. (1918): *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **101**, 165. u. **102**, 1.  
 Bona p. u. Grassheim K. (1922): *Biochem. Z.*, **134**, 146.  
 Ryffel W. (1923): *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **129**, 223.  
 Warburg O. (1909): *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **59**, 112.  
 Warburg O. (1911): *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **70**, 413.  
 Warburg O. (1912): *Münch. med. Wochenschr.*, **59**, 2550.  
 Warburg O. (1921): *Biochem. Z.*, **119**, 134.  
 Zuntz-Geppert: *Cit.* Burgsch u. Schittenhelm, Technik d. speziell. klin. Untersuchungsmethoden. I Teil (1914.) Abderhalden's Handbuch d. biochem. Arbeitsmethoden, Bd. III, Heft 2, (1910)

# ÜBER DIE GLYKOLYTISCHE KRAFT DES BLUTES

## IV. Mitteilung.

### Insulin und Glykolyse der Erythrozyten.

VON

YOSHIKANE KAWASHIMA.

*(Aus der biochemischen Abteilung des Instituts für Infektionskrankheiten  
der Kaiserlichen Universität zu Tokyo.*

*Vorstand: Dr. T. Kohmoto.)*

*(Eingegangen am 7. Juli 1924)*

## I. EINLEITUNG.

A. Slosse (1923) berichtet, dass  $\gamma$ -Strahlen des Radiums eine diminutive Beeinflussung auf das optische Rotationsvermögen der Glukose ausüben,  $\beta$ -Glukose in ihre tautomerische  $\gamma$ -Form transformierend, und dass die letztere dann viel leichter oxydabel als die erstere ist. Die kupferreduzierende Fähigkeit der Glukose aber bleibt dabei fast unverändert. Der Verfasser beweist auch, dass dieselbe Wirkung gegen die Glukose wie die der  $\gamma$ -Strahlen auch durch Insulin herbeigeführt worden ist. W. D. Forrest, W. Smith u. L. B. Winter (1923) sehen auch die Umwandlung in die  $\gamma$ -Form der  $\alpha$ - $\beta$ -Glukose durch Insulin, wobei nur die Drehung des Polarisationslichtes im Grade abnimmt. Sie sagen damit, dass beim Diabetes für die gesteigerte Verwertung des Zuckers nach Insulininjektion diese vermehrte  $\gamma$ -Formation verantwortlich sei. Wilhelm Laufberger (1924) ist aber ganz entgegengesetzter Ansicht zu genannten Autoren. Er konnte keine Transformation in die  $\gamma$ -Form der  $\alpha$ - $\beta$ -Glukose mit Insulin feststellen. An dieser Stelle will ich nun nicht tiefer in diese Richtung der Experimente eingehen, um den beiden differenten Ergebnissen nachzuforschen. Aber selbst die Voraussetzung der  $\gamma$ -Glukoseformation durch Insulin lässt die Frage offen bleiben,

dass beim Stehenbleiben der Blutkörperchenaufschwemmung im Brutschrank zuerst das in Zellen präformierte Insulin geschädigt und die Umwandlung der Glukose in die  $\gamma$ -Form, sogenannter erster Prozess der Glykolyse im Blute, unterbrochen werde, und infolgedessen die Glykolyse nicht mehr zutage trete, während die glykolytische Aktivität der Zellen noch nicht so gestört erhalten bleibe. Natürlich bleibt die Wirkungsweise des Insulins zur Zeit trotz mühevoller Forschung von vielen Autoren noch unerklärt. Also hier habe ich die Experimente auf Anraten und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Hayashi und Herrn Dr. Z. Hattai unternommen, um die Frage zu entscheiden, ob die veralteten Erythrozyten, die durch das eintägige Belassen im Brutschrank ihre glykolytische Kraft fast verloren haben, wie schon mittgeteilt (1922), durch neues Zufügen des Insulins wieder aktiviert werden oder nicht. Und zugleich wurde auch die Untersuchung über den Einfluss des Insulins auf die glykolytische Kraft der frischen Erythrozyten *in vitro* und *in vivo* ausgeführt.

## II. UNTERSUCHUNGSMETHODE.

Als Versuchstier wurde das Kaninchen verwendet, aus dessen Ohrvene die erforderliche Menge Blut entnommen und defibriniert wurde. Die 3-4mal mit der physiologischen Kochsalzlösung ausgewaschenen Blutkörperchen wurden wieder in derselben Lösung, zuweilen mit Pufferzusatz, aufgeschwemmt und bald in den Brutschrank von 37°C gestellt. Nach 24-stündigem Stehenlassen wurde diese Aufschwemmung in einige Reagensgläser verteilt, und mit Insulin und isotonischer Kochsalzlösung, welche Traubenzucker enthält, versetzt, um zur Untersuchung der Glykolyse angestellt zu werden. Zu den Kontrollproben wurde statt Insulin gleiche Menge Kochsalzlösung oder HCl-lösung, deren Azidität eben gleich derselben des Insulins ist, hinzugefügt. Sonst wurde auch als Kontrolle die einen Tage lang in Eiskammer aufbewahrte Blutkörperchenaufschwemmung benützt. Zur Zuckerbestimmung bediente ich mich ebenso wie früher des Mikroverfahrens von Bang. Die Bakterienfreiheit jeder Probe wurde ebenfalls stets durch

sowohl aerobe als auch anaerobe Kultur sichergestellt. Hier gebrauchtes Insulin war das Präparat mit 10 Einheiten pro 1 ccm aus der Toronto-Universität.

### III. ERGEBNISSE DER EXPERIMENTE.

#### A. Können die veralteten Erythrozyten durch Insulin wieder glykolytisch aktiviert werden?

##### 1. Erste Versuchsreihe.

Beim Versuch A handelt es sich um die Erythrozyten in der physiologischen Kochsalzlösung und es ist ohne weiteres verständlich, dass die Proben gemäss der Menge des zugesetzten Insulins mehr oder weniger sauer reagieren. Beim Versuch B müssen die  $H^+$ -Konzentrationen durch die Insulinzugabe nicht verändert werden, weil eine Pufferlösung von Blutalkaleszenz als Medium gebraucht wurde. Die Pufferlösung besteht aus 1 Teil physiologischer Kochsalzlösung und 2 Teilen Phosphatgemisch, welches  $m/7$  primäres und sekundäres Natriumphosphat im Verhältnis  $1:8 \left( \frac{Na_1-1}{Na_2-8} \right)$  enthält.

In allen Versuchsfällen wirkt das Insulin—im Verhältnis ca. 3, 15, 25, u. 30 Einheiten zu 100 ccm Blut hinzugesetzt—auf die glykolytische Kraft der veralteten Erythrozyten nicht erholend, sondern im allgemeinen etwas unterdrückend im Vergleich mit dem Kontrollversuche, wie aus der Tabelle I ersichtlich ist. Hier muss man aber beim Versuch B die etwaige Zerstörung des Insulins durch die Alkalität der Pufferlösung berücksichtigen. Dies bezüglich kann man die Untersuchungen von E. J. Witze-  
mann und L. Livshis (1923) in Betracht ziehen; nach ihnen haben  $Na_2CO_3$ ,  $NaHCO_3$  und  $Na_2HPO_4$  fast keine Wirkung auf Insulin, während  $(NH_4)OH$ ,  $NaOH$  und  $KOH$  von einer bestimmten Konzentration darauf zerstörend einwirken. Daraus ist es also verständlich, dass die so schwache Alkalität der Pufferlösung bei

TABELLE I.

Versuchsfälle	Insulin- einheit pro 100 cem Blut	Zuckergehalt in %		Zuckereinsparnis in		Zahl der Erythrozy- ten, Million	Relative Zucker- abnahme zu 1 Mill. Erythrozyten
		Vor dem Versuch	Nach 24 St. in 37° C.	mg	%		
A	1. Blutkörperchenaufschwem- mung + Zucker (Kontrolle)	0	0,242	0,213	29	12,0	4,5
	2. Desgleichen + Insulin	2,9	0,227	0,252	15	5,6	2,3
	3. Desgleichen	15	0,206	0,254	12	4,5	1,9
	4. Desgleichen	30	0,289	0,281	8	2,8	1,3
	5. NaCl-Lösung + Zucker + Insu- lin (ohne Blutzellen)	30	0,216	0,208	8	3,7	
B	1. Blutkörperchenaufschwem- mung mit Phosphatpuffer + Zucker (Kontrolle in E-K)	0	0,202	0,035	167	82,7	29,5
	2. Desgleichen (Kontrolle)	0	0,302	0,256	16*	5,3	2,7
	3. Desgleichen + Insulin	25	0,230	0,221	9	3,9	1,5
	4. Pufferlösung + Zucker + Insu- lin (ohne Blutzellen)	25	0,253	0,245	8	3,2	

B 1. (E-K) = Die vorher einen Tag lang in Eiskammer aufbewahrte Kontrollprobe; ebenso  
auch in allen folgenden.

TABELLE II.

Versuchsfälle	Insulineinheit pro 100 ccm Blut	Zuckergehalt in %		Zuckerabnahme in		Zahl der Erythrozy- ten, Million	Relative Zucker- abnahme zu 1 Mill. Erythrozyten
		Vor dem Versuch	Nach 24 St. in 37° C.	mg	%		
1. Blutkörperchenaufschwemmung + Zucker + HCl (Kontrolle, vorher in Eiskammer)	n/33 HCl 0,5 ccm pro 100 ccm	0,220	0,100	120	54,5	6,216	19,3
2. Desgleichen (Kontrolle, vorher in Brutschrank)	"	0,235	0,196	39	16,6	6,472	6,0
3. Desgleichen (HCl 20 mal verdünnt)	n/660 HCl 0,5 ccm pro 100 ccm	0,220	0,193	27	12,3	6,080	4,4
4. Desgleichen (Insulin statt HCl- lösung)	5(0,5 ccm pro 100 ccm)	0,208	0,186	22	10,6	6,400	3,4
5. Desgleichen (Insulin 20 mal verdünnt)	0,25 (0,5 ccm pro 100 ccm)	0,238	0,212	26	10,9	6,352	4,1
1. Blutkörperchenaufschwemmung mit Phosphatpuffer + Zucker + HCl (Kontrolle, vorher in Eiskammer)	n/33 HCl 0,5 ccm pro 100 ccm	0,262	0,042	220	84,0	5,232	42,0
2. Desgleichen (Kontrolle, vorher in Brutschrank)	"	0,257	0,243	14	5,4	4,872	2,9
3. Desgleichen (HCl 20 mal ver- dünnt)	n/660 HCl 0,5 ccm pro 100 ccm	0,273	0,257	16	5,9	5,248	3,0
4. Desgleichen (Insulin statt HCl- lösung)	5(0,5 ccm pro 100 ccm)	0,237	0,214	23	9,7	5,032	4,6
5. Desgleichen (Insulin 20 mal ver- dünnt)	0,25 (0,5 ccm pro 100 ccm)	0,250	0,230	20	8,0	6,376	3,1

Beim geringeren Zusatz von HCl-Lösung und Insulin wurden sie mit der physiologischen Kochsalzlösung 20 mal verdünnt.

meinen Experimenten keinen schädlichen Einfluss auf die Wirkung des Insulins ausüben kann. Ausserdem noch spricht die Erfahrung ebenfalls dafür, dass man das Insulin mit einem hervorragend guten Erfolg intravenös einspritzen kann.

## 2. *Zweite Versuchsreihe.*

Bei diesen Versuchen wurde die Azidität des Insulins im Voraus titrimetrische bestimmt (1 cem Insulin = 1,5 cem  $n/50$  NaOH, Phenolphthalein als Indikator gebraucht). Darauf wurde die Salzsäurelösung von ganz gleicher Azidität mit Insulin hergestellt (in den Tabellen ist diese Lösung einfach mit  $n/33$  HCl bezeichnet). Sie wurde nun zu Kontrollproben, die hier mit zwei Arten von der vorher einen Tag lang im Brutofen gestandenen und ebenso lang in Eiskammer aufbewahrten Blutkörperchenaufschwemmung zur Verfügung standen, statt Insulin den eigentlichen Versuchen hinzugesetzt. Die Ergebnisse des Versuchs sind in folgender Tabelle II zusammengestellt.

Wie die Tabelle zeigt, ist in der angewandten Insulindose—im Verhältnis von 5 oder 0,25 Einheiten zu 100 cem Blut—kein merklicher Einfluss auf die glykolytische Kraft der veralteten Erythrozyten zu erkennen. Mit anderen Worten, die glykolytische Kraft der veralteten Erythrozyten ist durch Insulin nicht aktiv beeinflusst, auch erfahren die vorher in Eiskammer aufbewahrten Kontrollproben dadurch keine Beeinflussung.

### B. Einfluss frischen oder älteren Serums, beziehungsweise mit Zusatz von Insulin, auf die glykolytische Kraft der veralteten Erythrozyten.

Nach 24-stündigem Stehenbleiben der Blutkörperchenaufschwemmung im Brutschrank wurden die Blutkörperchen durch die Zentrifuge von ihrem Medium möglichst befreit und in mehrere Proberröhrchen verteilt. Zu ihnen wurde das von einem anderen Kaninchen frisch entnommene und nach Gerinnung abgetrennte

TABELLE III.

Versuchsfälle	Insulineinheit pro 100 ccm Blut	Zuckergehalt in %		Zuckerabnahme in		Zahl der Erythrozy- ten, Million	Relative Zuckerabnah- me zu 1 Mill. Erythrozyten
		Vor dem Versuch	Nach 22 St. in 37° C.	mg	%		
1. Blutzellenbrei + Serum (alt) + Zucker		0,200	0,016	184	92,0	7,304	25,2
2. Desgleichen (Serum frisch)		0,364	0,185	179	49,2	6,152	29 1
3. Desgleichen (Serum alt)		0,255	0,232	23	9,0	7,048	3,3
4. Desgleichen (Serum frisch)		0,248	0,227	21	8,5	7,712	2,7
5. Desgleichen (Serum frisch) + HCl	1/33 HCl 0,5 ccm pro 100 ccm	0 248	0,230	18	7,3	5,848	3,1
6. Desgleichen (Serum frisch) + Insulin	5 (0,5 ccm pro 100 ccm)	0,235	0,204	31	13,2	6,376	4,9
7. Frisches Serum + Zucker + Insulin (ohne Blutzellen)	5 (0,5 ccm pro 100 ccm)	0,292	0,285	7	2,4		

Fall 1 u. 2 = Die vorher 24 Stunden lang in Eiskammer  
aufbewahrten Kontrollproben.

Serum oder das vorher 24 Stunden lang im Brutschrank aufbewahrte Serum, beziehungsweise darauf Insulin, hinzugefügt. Nach dem nochmaligen Versetzen mit Zucker waren alle Proben wieder 22 Stunden lang in 37°C gestellt, um auf Glykolyse zu untersuchen.

Wie aus der Tabelle III verständlich ist, bleiben das zugesetzte frische oder ältere Serum und Insulin ganz indifferent zur glykolytischen Kraft der veralteten Erythrozyten. Hier sieht man auch aus Fall 1 u. 2, dass kein Unterschied zwischen den beiden glykolytischen Kräften der Erythrozyten mit frischem oder älterem Serum vorhanden ist.

### C. Wird die glykolytische Kraft der frischen Erythrozyten durch Insulinzusatz erhöht?

#### 1. Versuch *in vitro*.

Seit der Entdeckung des Insulins wurden Experimente über den Einfluss auf die Glykolyse des Blutes von einigen Autoren, Hepburn u. Latschford (1922), und Mc. Cormick, Macleod, Noble u. O'Brien (1923), ausgeführt. Nach ihnen hat das Insulin keinen Einfluss auf die Glykolyse. Das Ergebnis meines Experimentes stimmt auch mit demjenigen von genannten Autoren überein, wie in der Tabelle IV zusammengestellt ist. Die hinzugefügte Insulinmenge zur Blutkörperchenaufschwemmung ist im Verhältnis 100 cem Blut:1, 5, bzw. 10 Einheiten Insulin.

#### 2. Versuch *in vivo*.

Bei diesem Versuche wurde das Insulin—in der Dosis von 1 Einheit pro 2000 g Körpergewicht—am Kaninchen morgens nüchtern subkutan injiziert und nach einigen Stunden, wo nach der Blutzucker des Kaninchens dadurch stark niedergegangen war, wieder das Blut entnommen, um die glykolytische Kraft der Erythrozyten in betreffender Zeit zu untersuchen. Kurz vor der Blutentnahme wurde auch der Blutzucker bestimmt. Als Kontrollen wurden ebenso der Zuckergehalt des Blutes und die

TABELLE IV.

Versuchsfälle	Insulineinheit pro 100 ccm Blut	Zuckergehalt in %			Zuckerabnahme in		Zahl der Erythrozyten, Million	Relative Zuckerabnahme zu 1 Mill. Erythrozyten
		Vor dem Versuch	Nach 5 St. in 37° C.	Nach 24 St. in 37° C.	mg	%		
1. Blutkörperchenaufschwemmung mit Phosphatpuffer + Zucker + HCl	n/33 HCl 0,5 ccm pro 100 ccm	0,206		0,054	252	82,4	4,408	57,2
2. Desgleichen (HCl 20 mal verdünnt)	n/660 HCl 1,0 ccm pro 100 ccm	0,205		0,057	248	81,3	4,488	55,3
3. Desgleichen (Insulin statt HCl-Lösung)	5 (0,5 ccm pro 100 ccm)	0,335		0,067	268	80,0	4,352	60,9
4. Desgleichen (Insulin 20 mal verdünnt)	1 (2,0 ccm pro 100 ccm)	0,320		0,072	248	77,5	4,528	54,8
1. Blutkörperchenaufschwemmung mit Phosphatpuffer + Zucker + HCl	n/33 HCl 0,5 ccm pro 100 ccm	0,277	0,157		120	43,3	5,376	22,3
2. Desgleichen	n/33 HCl 1,0 ccm pro 100 ccm	0,242	0,147		95	39,3	5,416	17,5
3. Desgleichen (Insulin statt HCl-Lösung)	5 (0,5 ccm pro 100 ccm)	0,285	0,182		103	36,1	5,336	19,3
4. Desgleichen	10 (1,0 ccm pro 100 ccm)	0,260	0,133		127	48,8	5,536	22,9

TABELLE V.

No.	Körper- gewicht in g	Injizierte Insulin- Menge in Einheit u. (cem)	Blutzucker d. Kanin- chens in %	Zuckergehalt d. Blutkörperchen- aufschwemmung in „o“		Zuckerabnahme in		Zahl der Erythro- zyt., Mill.	Zahl d. Leuko- zyten	Relativ. Zuckero- abnahme zu I Mill. Erythr. zyten
				Vor dem Versuch	Nach 22-24 St. in 27° C.	mg	%			
I Vor Injektion 3 St. danach	1845 ♀	1 (0,1)	0,085 0,032	0,241 0,330	0,136 0,141	105 189	43,6 57,3	7,2 7,7		14,6 24,5
II Vor Injektion 3 St. danach	3530 ♀	1,75 (0,175)	0,093 0,052	0,259 0,231	0,178 0,152	81 79	31,3 34,2	4,472 4,632	4700 7300	18,1 17,1
III Vor Injektion 1 1/2 St. danach	1930 ♂	1 (0,1)	0,102 0,035	0,314 0,297	0,251 0,207	93 90	27,0 30,3	5,392 6,286	3000 3400	17,2 14,3
IV Vor Injektion 4 St. danach	1850 ♀	0,8 (0,08)	0,111 0,050	0,390 0,363	0,194 0,186	196 177	50,3 48,8	5,656 5,010	3700 4300	34,7 35,1

No. I-III = Die Blutkörperchenaufschwemmung in der physiologischen NaCl-Lösung.  
No. IV = Versuch mit dem Vollblut.

In allen Versuchsfällen wurde keine Nahrung bis zum zweimaligen Entnehmen des Blutes gegeben.

No. I = Vor der Insulin-Injektion wurde das Kaninchen 21 St. lang nicht gefüttert.

No. II-IV = Am Mittag des vorangehenden Tages wurden die Versuchstiere mit genügender Nahrung gefüttert, seither mit keiner Nahrung, und am nächsten Morgen nüchtern zur Untersuchung herangezogen.

No. I-3 St. nach Injektion wurde das Tier komatös gefunden, bald 2 cem 10% Traubenzuckerlösung intravenös eingespritzt, danach die Extremitäten etwas beweglich, Atmenot stark, dann das Blut für Zuckerbestimmung mit Filterpapier aufgesaugt. Nun trat plötzlich Krampf ein, ca 8 cem Traubenzuckerlösung ebenfalls intravenös injiziert, kurz danach erhobte sich das Kaninchen und stand auf. Dabei wurde das Blut zur Glykolyseuntersuchung entnommen. Ausserdem wurde bei diesem Fall zu viel Blut—vor der Insulininjektion 2 mal hintereinander—entnommen, da das zuerst aufgefangene Blut wegen des Zerbrechens des Gefässes verloren ging.

No. II u. IV = Bis zur Blutentnahme nach Insulin war kein Zeichen von starker Hypoglykämie zu beobachten.  
No. III = 1 1/2 Stunden nach Insulin wurde das Tier ziemlich stark vergiftet gefunden, mit Symptomen von allgemeiner Exzitation, besonders Kraftlosigkeit der Beine, u. z. stark am hinteren Beinen. Die Halsmuskeln waren auch stark entspannt, so dass der Kopf nicht nach oben in normaler Stellung gehalten werden konnte. Dabei wurde das Blut entnommen und erst danach die Traubenzuckerlösung therapeutisch intravenös eingespritzt.

Glykolyse bald vor der Insulin-injektion untersucht, wobei ich berücksichtigte, die Blutentnahme auf eine möglichst kleine Menge zu beschränken, um irgendeinen Einfluss von Seiten der Anämie auf die Versuchsergebnisse zu vermeiden.

Wie aus der Tabelle V zu ersehen ist, übt das Insulin, einige Stunden vorher subkutan injiziert, hier auch keinen guten Einfluss auf die glykolytische Kraft der Erythrozyten aus. Nur bei No. I war Glykolyse nach Insulin stärker als die vor Insulin. Weil aber der Versuch dabei unter den in Fussnote aufgezeichneten Bedingungen ausgeführt wurde, so kann das Ergebnis ohne weitere Berücksichtigung nicht verwertet werden. Jedenfalls kann man aus den Ergebnissen der anderen vorsichtig unternommenen Fälle schliessen, dass die glykolytische Kraft der Erythrozyten durch Insulin, welches vorläufig im Körper des Versuchstiers mit ihnen in Berührung gekommen ist, nicht besonders beeinflusst wird.

#### IV. SCHLUSSFOLGERUNGEN.

1. Veraltete Erythrozyten werden durch Insulin nicht wieder glykolytisch aktiviert. Von gleichem Verhalten ist auch das frische Serum.

2. Auf die glykolytische Kraft der frischen Erythrozyten übt das Insulin *in vitro* keinen Einfluss aus.

3. Die Erythrozyten, in einigen Stunden nach der subkutanen Insulin-injektion entnommen, zeigen an der Stärke ihrer glykolytischen Kraft fast keinen Unterschied zum Vergleich mit derselben der normalen Erythrozyten.

4. Die Ergebnisse meiner vorigen Mitteilungen, dass die glykolytische Kraft der Erythrozyten mit ihrer Lebensaktivität eng verknüpft ist und bei ihrem eintägigen Belassen im Brutschrank meistens schon verloren geht, sind auch hier wiederum bestätigt worden.

## LITERATUR.

- Forrest W. D., Smith W. u. Winter L. B. (1923): *Jl. of Physiol.*, **57**, 221.  
Hepburn I. u. Latschford I. K. (1922): *Americ. Jl. of Physiol.*, **62**, 177.  
Kawashima, Y. (1922): *Jl. of Biochem.*, **2**, 131.  
Kawashima, Y. (1924): *Jl. of Biochem.*, **3**, 273.  
Laufberger, W. (1924): *Klin. Wochenschr.*, **3**, 264.  
McCormick, N. A., Macleod J. J. R., Noble, E. C. u. O'Brien, K. (1923):  
*Jl. of Physiol.*, **57**, 247.  
Slosse, A. (1923): *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **89**, 96.  
Slosse, A. (1923): *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **89**, 98.  
Witzemann, E. J. u. Livshis, L. (1923): *Jl. of biolog. Chem.* **58**, 463.

# ÜBER DAS VERHALTEN DER MALONSÄURE UND EINIGER DIKARBONSÄUREN IM TIERKÖRPER BEI LEBERDURCHBLUTUNG.

VON

GORO MOMOSE.

(Aus dem Laboratorium der I. medizinischen Klinik der Kgl.  
Charité zu Berlin und dem hygienischen Institut der  
medizinischen Akademie zu Tokio.)

(Eingegangen am 25. August 1924.)

Trotzdem die aliphatischen Dikarbonsäuren zwar theoretisch mit Recht als Abbaustationen sowohl der Kohlenhydrate als auch der Eiweisskörper im intermediären Stoffwechsel in Frage kommen, ist doch unsere tatsächliche Kenntnis über den Abbau der Dikarbonsäuren im Tierkörper heute noch recht mangelhaft. Aminodikarbonsäuren, so z. B. Asparaginsäure und Glutaminsäure stehen wegen ihres Abbaumodus in der  $\alpha$ -Stellung, auf Grund der Tatsache, welche  $\alpha$ -Aminosäuren festgestellt wurde, mit der Malonsäure bezw. Bernsteinsäure in einer innigen Beziehung. Nach Pohl (1896) werden die Malonsäure, die Tartronsäure und die Mesoxalsäure in erheblichem Umfange im Tierkörper zerstört. Die näheren chemischen Prozesse, die sich bei dem physiologischen Abbau dieser Säuren abspielen, sind aber bisher unbekannt geblieben. Für die Bernsteinsäure dagegen ist durch Battelli und Stern (1911) gezeigt worden, dass sie durch Organfermente zu Äpfelsäure oxydiert wird. Mithin ist es möglich, dass diese Reaktion den Weg des Abbaues der Bernsteinsäure im intermediären Stoffwechsel anzeigt.

Durch Versuche, die im Laboratorium Embdons ausgeführt worden sind, ist gezeigt worden, dass auch für die Dikarbonsäuren Beziehungen zu den Acetonkörpern vorhanden sind. So beobachtete J. Wirth (1911), dass Zuckersäure die Acetessigsäurebildung in der überlebenden Leber regelmässig steigert, während

die Wirkung der Gluconsäure und der Schleimsäure auf die Acetessigsäurebildung unsicher war. K. Ohta (1912), der die Untersuchungen von Wirth fortsetzte, fand, dass d-Weinsäure, Traubensäure und Maleinsäure Acetessigsäure zu bilden vermögen, während die Bernsteinsäure nur in einem Versuch zu einer Steigerung der Acetonbildung führte.

Bei den nahen chemischen Beziehungen, die die Malonsäure auch zur Essigsäure aufweist, und unter Berücksichtigung der durch A. Loeb (1912) beobachteten Bildung von Acetessigsäure aus Essigsäure interessierte es uns zu untersuchen, ob auch für die Malonsäure ein Übergang in Acetessigsäure im Durchblutungsversuch nachzuweisen ist.

Wie im folgenden dargestellt, habe ich die jodbindende, durch Silberoxyd zerstörbare Substanz, welche unter Umständen bei der Leberdurchblutung auftritt und von einigen Autoren beobachtet wurde, näher untersucht. Mit der Hoffnung, dass die Erkenntnis dieser Substanz eventuell auf den Chemismus des intermediären Stoffwechsels Licht werfen würde, habe ich verschiedene Vergleichsversuche angestellt und dabei festgestellt, dass es sich bei der fraglichen Substanz höchstwahrscheinlich um das intermediär auftretende Aldol handelt. Über die diesbezügliche theoretische Überlegung mit den experimentellen Daten verweise ich auf den II. Teil.

Ausserdem habe ich mit d-Zuckersäure und d-Weinsäure Durchblutungsversuche angestellt und konnte dabei keine Acetonbildung konstatieren. Die Ergebnisse darüber werde ich im III. Teil ausführlich beschreiben.

## I. VERSUCHE ÜBER DIE BILDUNG VON ACETESSIGSÄURE AUS MALONSÄURE.

Ich führte die Durchblutung an überlebenden Lebern von Hunden aus, die 24 Stunden gehungert hatten. Als Durchblutungsflüssigkeit diente ein Gemisch von 1400 ccm frischen defibrinierten Rinderblutes und 100 ccm physiologischer Kochsalzlösung, die 2 g Malonsäure mit Natronlauge neutralisiert enthält. Für die Ver-

suche benutzte ich im wesentlichen die gleichen Apparate, wie sie E. Friedmann und seine Mitarbeitern verwandten. Die Technik der Versuche war die übliche. Nach Beendigung des Durchblutungsversuches wurde dieses Blut nach Schenk mit zwei-prozentiger Salzsäure und gesättigter Sublimatlösung enteiweiss.

Je 500 ccm Filtrat wurden destilliert, am Destillat wurde nach Huppert und Messinger mit 1/10 n-Thiosulfatlösung und 1/10 n-Jodlösung die Acetonbestimmung ausgeführt.

Unter Berücksichtigung der Beobachtungen von N. Masuda (1912) und K. Ohta (1912), die gefunden hatten, dass bei der Durchströmung der überlebenden Leber unter Zusatz von Dikarbonsäuren flüchtige, jodbindende Substanzen auftreten, die durch Kochen mit Silberoxyd nach dem Verfahren von Masuda zerstört werden, stellte ich auch die Menge der jodbindenden Substanzen des Destillates, das aus 500 ccm des nach der Enteiweissung nach Schenk geronnenen Filtrates stammte, mit Silberoxyd fest. Zu diesem Zweck bediente ich mich eines einfachen Apparates. Ein Destillationskolben, dessen Oberfläche eine Marke trägt, die das Volumen der zu destillierenden Flüssigkeit anzeigt, ist mittels eines Gummistopfens mit einem Schlangenkühler verbunden. Dieser Schlangenkühler ist an seinem oberen Ende wiederum mittels eines Gummistopfens mit dem einen Ende eines zweimal rechtwinklig gebogenen Glasrohres verbunden, das an seinem anderen Ende durch einen zweiten Schlangenkühler in einen Runkolben führt, der als Vorlage dient. Nun werden 500 ccm Filtrat destilliert. Das erste Destillat wird von neuem in den Destillationskolben dieser Vorrichtung gebracht und mit Wasser auf 500 ccm aufgefüllt, sodann wird eine ausreichende Menge frisch gefällten feuchten Silberoxyds und etwas Talkum hinzugefügt. Der Rückflusskühler wird nun eingeschaltet und der Destillationskolben erhitzt. Inzwischen wird der Vorlagekolben mit Eis gekühlt und der zweite absteigende Schlangenkühler eingeschaltet. Nachdem die Flüssigkeit im Destillationskolben etwa 15 Minuten lang zum Sieden erhitzt ist, wird der

TABELLE I.

1	2	3	4	5		6	7			8	9
Nummer des Versuches	Gewicht des Hundes	Gewicht der Leber	Durchblutungsflüssigkeit	Durchblutungs	Zeit	Druck während der Durchblutung	Verbrauchte 1/10 n-Jodlösung			Menge von 500 cem Filtrat des Durchblutes mit Ag <sub>2</sub> O jodbindender Substanz cem	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Acetons mg
							a)	b)	c)		
					Min.	mm Hg.	von 500 cem Filtrat des Normalblutes direkt destilliert.	von 500 cem Filtrat des Durchblutes direkt destilliert	von 500 cem Filtrat des Durchblutes nach Reduktion mit Ag <sub>2</sub> O mit Ag <sub>2</sub> O cem		
1	500	126	2 g Malonsäure mit NaOH neutralisiert 100 cem physiologische Kochsalzlösung 1400 cem Kinderblut	74	8	16-38	1.29	6.41	3.37	3.01	25.9
2	7000	63	do	76	16	24-28	0.73	8.40	6.18	2.22	68.4
3	6900	225	do	72	18	24	0.54	3.18	1.18	2.00	8.4
4	3000	91	do	85	4	31-66	0.63	3.43	1.63	1.80	13.0
5	3500	123	do	83	7	48-50	0.87	4.13	2.88	1.25	25.7
6	5800	129	do	77	10	28-32	0.92	7.10	5.10	2.00	52.7
7	3000	106	do	88	8	31-48	0.91	4.84	3.10	1.84	28.0
8	9000	239	do	77	15	22	1.08	4.69	2.80	1.89	22.3
9	9000	131	do	76	13	22	1.08	4.27	2.58	1.69	19.6

erste aufsteigende Rückflusskühler ausgeschaltet, indem man dabei einfach das Kühlwasser entfernt. Dann wird die Destillation fortgesetzt, sodass 200 bis 250 ccm Destillat überdestilliert werden. Von diesem Destillat wurde die Acetonmenge nach Huppert-Messingers Methode bestimmt.

Ausserdem wurde gleichzeitig zwecks des Vergleiches das Aceton in je 500 ccm Filtrat des nach Schenk geronnenen Normalblutes, das zum Durchblutungsversuch gedient hatte, nach Messinger-Huppert bestimmt.

Die bei der Leberdurchblutung unter Zusatz von Malonsäure erhaltenen Resultate sind in der nebenstehenden Tabelle I zusammengestellt.

Die Kolonne 7 dieser Tabelle zeigt die gebundene Menge der 1/10 n-Jodlösung in dem destillierten Anteil: a) von 500 ccm Filtrat des Normalblutes; b) von 500 ccm Filtrat des Durchblutes; c) von 500 ccm Filtrat des Durchblutes nach der Redestillation mit Silberoxyd. In der Kolonne 8 findet man die Differenzzahl von b) und c) repräsentiert als die Menge einer durch Silberoxyd zerstörbaren und 1/10 n-Jodlösung bindenden Substanz von 500 ccm Filtrat des Durchblutes. Aus Kolonne 9 ist die Menge des pro Liter Blut neugebildeten Acetons, das aus c) und a) berechnet wurde, ersichtlich.

Die neun Versuche, die ich unter Zusatz von Malonsäure zum Durchblutungsblute ausgeführt habe, zeigen übereinstimmend, dass bei der Durchblutung mit Malonsäure nicht unbeträchtliche Mengen einer jodbindenden flüchtigen Substanz entstehen, die durch Silberoxyd zerstört wird und demnach kein Aceton ist.

Die nach dem Verfahren von Masuda (1912) ermittelten Acetonwerte (19 mg pro Liter Blut) ergeben nur in zwei Versuchen (Versuch 2 und 6) eine Steigerung des pro Liter Blut neugebildeten Acetons. In diesen beiden Versuchen liegt die Möglichkeit vor, dass das neugebildete Aceton aus der der Durchblutungsflüssigkeit zugesetzten Malonsäure herrührt. Sollte diese Annahme zutreffen, so könnte man diesen Übergang von Malonsäure in Acetessigsäure durch ein intermediäres Auftreten von Essigsäure deuten:



Immerhin bieten diese beiden positiv ausgefallenen Versuche einen Hinweis darauf, dass auch intermediär auftretende Essigsäure in Acetessigsäure übergehen kann, ein Hinweis, der in Anbetracht der Rolle, die die Essigsäure im Sinne der typischen  $\beta$ -Oxydation beim Abbau der Fettsäuren spielt, Beachtung beansprucht.

## II. UNTERSUCHUNG ÜBER DIE JODBINDENDE UND DURCH SILBEROXYD ZERSTÖRBARE SUBSTANZ AUS MALONSÄURE.

In einer Untersuchung haben G. Embden und M. Oppenheimer (1912) die Beobachtung gemacht, dass die Brenztraubensäure in der künstlich durchbluteten Leber Acetessigsäure bildet. Diese Bildung trat nicht mit völliger Regelmässigkeit ein. Sie waren der Ansicht, dass der Weg von der Brenztraubensäure zur Acetessigsäure offenbar über Acetaldehyd führe und die vielleicht unter Aldolkondensation erfolgende Acetessigsäurebildung aus dem Acetaldehyd nur eine Nebenreaktion sei, während der Hauptweg des Acetaldehydabbaues über Essigsäure führen dürfte, wofür der Beweis aber noch aussteht.

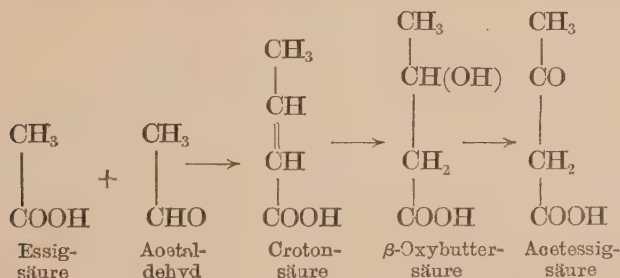
A. Loeb (1912) hat in zehn übereinstimmenden Versuchen festgestellt, dass die Essigsäure den Umfang der Acetessigsäurebildung in der Leber unter den von Embden und seinen Mitarbeitern gewählten Bedingungen ganz regelmässig und ganz beträchtlich steigert. Er erklärte diese Beobachtung durch die Annahme, dass die Gegenwart der Essigsäure den Abbau der Acetessigsäure hemmt, wobei der folgende reversible Gleichung in Betracht kommt:



Auch könnte die Essigsäure hemmend auf die Oxydation von Acetaldehyd zu Essigsäure einwirken, sodass der in der Leber gebildete Acetaldehyd in vermehrtem Umfange einen Seitenweg

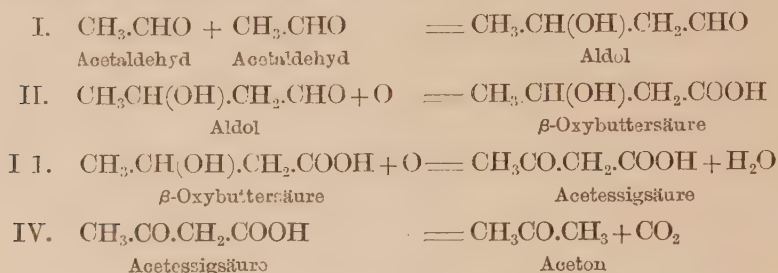
zur Acetessigsäure einschlägt (vgl. Embden und Oppenheimer). Eine derartige Formulierung könnte besagen, dass man eine direkte Neubildung von Acetessigsäure aus der Essigsäure annehmen muss, wobei ein Molekül Essigsäure mit einem zweiten unter Wasseraustritt zu Acetessigsäure zusammentreten würde.

Dieses Resultat von Loeb steht im Gegensatz zu Angaben, die E. Friedmann (1908) gemacht hat, nach denen er eine Einwirkung der Essigsäure auf die Grösse der Acetessigsäurebildung in zwei Durchströmungsversuchen nicht hatte feststellen können. Friedmann (1913) hat deshalb nachher diesen Widerspruch durch die Durchblutungsversuche aufzuklären versucht. Er fand, dass das Blut, dem Essigsäure zugesetzt war, beim Durchleiten durch die glykogenarme Leber in drei Versuchen den Umfang der Acetessigsäurebildung übereinstimmend zu erhöhen vermag, während in der glykogenreichen Leber in vier Versuchen die Acetessigsäure nicht neugebildet wurde. Damit könnte also nur in der Leber, die sich im Zustand der Glykogenverarmung befindet, eine Acetessigsäurebildung von Essigsäure stattfinden. Er hat daraufhin die Vermutung ausgesprochen, dass dieser Reaktionsmechanismus möglicherweise durch Kondensation von intermediär entstandenen Acetaldehyd mit Essigsäure im Sinne der folgenden Formeln zu deuten sei:



In diesem Zusammenhang dürfte es auch von Interesse sein, an die früheren Versuche von Friedmann (1908) zu erinnern, bei denen der Acetaldehyd den Umfang der Acetessigsäurebildung bei der Leberdurchblutung von ausgehungerten Hunden zu steigern vermochte. Bei der chemisch leichten Kondensierbarkeit des

Acetaldehyds zum Aldol und der nachgewiesenen Bildung von Acetessigsäure aus Aldol hat er die Vermutung ausgesprochen, dass die Synthese der Acetessigsäure bei der Durchblutung aus Aldehyd über die Zwischenstufe des Aldols verläuft und hat diese Reaktionskette in folgender Weise formuliert :



Wenn der Reaktionsmechanismus von Loeb, wonach die Essigsäure in der Leber direkt in Acetessigsäure übergeht und der Acetaldehyd unter den Versuchsbedingungen der Durchblutungsexperimente in Essigsäure umgewandelt werden kann, die richtige Deutung wäre, so sollte die Formulierung Friedmanns an Beweiskraft verlieren, weil sodann dabei mit der Möglichkeit zu rechnen ist, dass die Bildung von Acetessigsäure aus Acetaldehyd nicht über die Zwischenstufe des Aldols, sondern über die der Essigsäure verläuft.

Unter diesen Umständen habe ich ausdrücklich im I. Teil bemerkt, dass die Malonsäure bei der Leberdurchblutung auf dem Weg über die Essigsäure zur Acetessigsäure zur Acetessigsäure abgebaut zu werden und daneben gleichzeitig eine nicht unbeträchtliche Menge von jodbindenden, mit Silberoxyd zerstörbaren Substanzen neuzubilden vermag. Auf welche Weise kann man nun aber die aus Malonsäure entstandene Essigsäure in Acetessigsäure übergeben? Vielleicht liesse sich dafür eine Erklärung geben, wenn die Natur dieser jodbindenden, mit Silberoxyd zerstörbaren Substanz klargestellt würde. Trotzdem Masuda und Ohta zuerst gefunden haben, dass bei der Durchblutung der überlebenden Lebern unter Zusatz von Dikarbonsäuren flüchtige

jodbindende, mit Silberoxyd zerstörbare Substanzen auftreten, haben sie doch über die Natur dieser Substanzen keine Aufklärung gegeben. Für mich war es aber sehr interessant, die Natur dieser aus Malonsäure entstandenen jodbindenden, mit Silberoxyd zerstörbaren Substanzen eingehend zu erforschen. Es ist aber ganz ausgeschlossen, dass diese Substanz aus dem Filtrat rein dargestellt wurde, da die gefundenen Mengen zu gering sind. Ich bemühte mich deshalb, die Filtrate des nach Schenk geronnenen Durchblutes, das in den vorliegenden Versuchen benutzt wurde, sowie einige theoretisch in Erwägung kommende Substanzen für die Vergleichsversuche in folgender Weise vergleichend zu untersuchen, um die Natur der fraglichen Substanz zu eruieren.

#### *Versuch 10.*

1 ccm Aceton wurde mit Wasser auf 100 ccm und hiervon 10 ccm auf 1000 ccm aufgefüllt.

100 ccm dieser Lösung wurden nach dem Zusatz von 400 ccm Wasser direkt destilliert, das Destillat wurde nach Messinger-Huppert titriert. Es wurden 8.60 ccm 1/10 n-Jodlösung verbraucht.

Andererseits wurden 100 ccm der Lösung nach dem Zusatz von 400 ccm Wasser destilliert, das Destillat wurde mit Silberoxyd behandelt, nochmals destilliert und das Destillat titriert. Verbraucht wurden 8.30 ccm 1/10 n-Jodlösung.

Dieses Verhalten des Acetons zeigt, dass die im Filtrat des Durchblutes vorhandene jodbindende, mit Silberoxyd zerstörbare Substanz kein Aceton ist.

#### *Versuch 11.*

(Für diesen Versuch wurde das Filtrat von Versuch 2 benutzt.)

500 ccm Filtrat wurden destilliert. Das Destillat wurde mit Wasser auf 400 ccm aufgefüllt. Zwei Parallelversuche wurden angestellt.

200 ccm davon einerseits direkt mit Kaliumbisulfitlösung nach Ripper behandelt und mit 1/10 n-Jodlösung zurücktitriert. Es wurden 15.82 ccm 1/10 n-Jodlösung für die benutzten 20.00 ccm  $\text{KHSO}_3$ -Lösung verbraucht.

Andererseits wurden 200 ccm davon zuerst mit Silberoxyd behandelt und destilliert, das Destillat mit Wasser auf 200 ccm gefüllt, nach Ripper behandelt und dann titriert. Es wurden 15.65 ccm 1/10 n-Jodlösung für die 20.00 ccm  $\text{KHSO}_3$ -Lösung verbraucht.

Titer der benutzten Kaliumbisulfitlösung :

1/10 n-Jodlösung :  $\text{KHSO}_3$ -Lösung = 15.90 ccm : 20.00 ccm

Diese Zahlen zeigen, dass das Filtrat sich vor und nach der Oxydation mit Silberoxyd gegenüber der Kaliumbisulfitlösung nicht änderte und zwar mit der letzteren in keine oder nur spurenweise Bindung eintrat. Das Resultat besagt, dass die mit Silberoxyd zerstörbare Substanz im Filtrate kaum in nachweisbarer Menge vom Kaliumbisulfit gebunden wird. Allerdings zeigen die Analysenzahlen eine spurenweise Bindung, aber innerhalb der Versuchsfehlergrenzen, sodass man dabei nichts Sicheres sagen kann.

### *Versuch 12.*

1 ccm Acetaldehyd wurde mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt (Lösung I); hiervon wurden 10 ccm auf 1000 ccm aufgefüllt (Lösung II).

100 ccm von der Lösung II wurden mit 400 ccm Wasser verdünnt und direkt destilliert. Das Destillat wurde nach Messinger-Huppert jodmetrisch titriert, verbraucht wurden 4.30 ccm 1/10 n-Jodlösung.

100 ccm von der anderen Portion der Lösung II wurden mit 400 ccm Wasser verdünnt, destilliert, das Destillat mit Silberoxyd gekocht und destilliert, dieses Destillat titriert, verbraucht wurden 0.45 ccm 1/10 n-Jodlösung.

15 ccm von der Lösung I wurden mit Wasser auf 1000 ccm aufgefüllt, 100 ccm davon mit 400 ccm Wasser verdünnt und destilliert. Das Destillat wurde mit Wasser auf 500 ccm gefüllt, mit Kaliumbisulfitlösung nach Ripper behandelt und mit 1/10

n-Jodlösung zurücktitriert. Es wurden 17.10 cem 1/10 n-Jodlösung für die benutzten 20.00 cem  $\text{KHSO}_3$ -Lösung verbraucht.

Titer der benutzten Kaliumbisulfitlösung:

1/10 n-Jodlösung :  $\text{KHSO}_3$ -Lösung = 20.98 cem : 20.00 cem

Die Versuche zeigen, dass Acetaldehyd zwar vom Silberoxyd zerstört, aber anderseits, wenn nicht mit Silberoxyd vorbehandelt, sofort vom Kaliumbisulfit gebunden wird. In Anbetracht der Versuche 11 und 12 sieht man, dass die im Filtrat des Durchblutes vorhandene jodbindende, mit Silberoxyd zerstörbare Substanz kein Acetaldehyd ist.

#### *Versuch 13.*

2 g  $\beta$ -Oxybuttersäure wurden in wenig Wasser gelöst und mit Natronlauge genau neutralisiert; die Lösung wurde auf 1000 cem aufgefüllt (Lösung I). 100 cem von der Lösung I wurden mit 900 cem Rinderblut versetzt, diese Flüssigkeit nach Schenk enteiweisst und filtriert. Das ganze Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit, filtriert, das Filtrat durch Luft vom Schwefelwasserstoff befreit und filtriert, 600 cem Filtrat wurden mit Natronlauge genau neutralisiert, mit wenig Salzsäure angesäuert und im Vakuum auf 600 cem eingeengt (Lösung II).

300 cem von der Lösung II wurden direkt destilliert, das Destillat nach Messinger-Huppert jodmetrisch titriert. Es wurden 4.73 cem 1/10 n-Jodlösung verbraucht.

300 cem von der anderen Portion der Lösung II wurden zuerst mit Silberoxyd gekocht, dann destilliert, das Destillat wurde titriert. Verbraucht wurden 4.80 cem 1/10 n-Jodlösung.

Das Resultat zeigt, dass die  $\beta$ -Oxybuttersäure durch die Behandlung mit Silberoxyd keinen Einfluss erleidet. Somit ist die im Filtrat des Durchblutes vorhandene jodbindende, mit Silberoxyd zerstörbare Substanz keine  $\beta$ -Oxybuttersäure.

#### *Versuch 14.*

0.2 g Malonsäure wurden in 200 cem Wasser gelöst, 100 cem

hiervon auf 500 ccm verdünnt und destilliert, das Destillat jodmetrisch titriert. Kein Jodverbrauch.

100 ccm hiervon auf 500 ccm verdünnt, destilliert, das Destillat mit Silberoxyd behandelt und destilliert, das Destillat titriert. Kein Jodverbrauch.

Das zur Durchblutung benutzte Präparat von Malonsäure zeigte somit nach der Destillation keine jodbindende Eigenschaft nach und vor der Behandlung mit Silberoxyd.

Auch bezüglich der Frage, ob die jodbindende, mit Silberoxyd zerstörbare Substanz bei der überlebenden Leber mit Rinderblut ohne Zusatz entstehen kann, hat Masuda (1912) früher die Beobachtung gemacht, dass eine merkliche Menge dieser Substanz in seinen drei Durchblutungsversuchen nicht gebildet wurde.

Die flüchtige jodbindende, mit Silberoxyd zerstörbare Substanz, welche nach meinem Durchblutungsversuche aus Malonsäure herrührte, wurde mithin infolge der Durchblutung gebildet. Betreffs des Wesens der fraglichen Substanz erübrigt sich nun theoretisch die Wahl zwischen Crotonsäure resp. Crotonaldehyd und Aldol, nachdem die sonstigen denkbaren Substanzen durch die oben erwähnten Vergleichsversuche ausgeschlossen sind. Crotonsäure ist bekanntlich nach dem Versuche von Friedmann (1908) ein ausgesprochener Acetonbildner bei der Leberdurchblutung. Die Acetonbildung aus Malonsäure ist aber nur geringfügig, wie man aus der Tabelle I ersieht. Wenn die Crotonsäure resp. Crotonaldehyd dabei intermediär entstanden wäre, müsste die Acetonkörperbildung aus Malonsäure noch reichlicher stattfinden, und zwar gibt es keinen Grund mehr, dass das Endprodukt Aceton resp. Acetessigsäure trotz der relativ massenhaften Bildung der leicht übergangbaren Zwischensubstanz (Crotonsäure) so wenig bleibt. Crotonsäure resp. Crotonaldehyd darf man wohl somit ausser Acht lassen. Ich beschäftigte mich deshalb nunmehr mit Aldol.

#### *Versuch 15.*

Aldol wurde im Vakuum frisch destilliert. 1 g Substanz wurde mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt, hiervon wurden 10 ccm auf 1000 ccm aufgefüllt.

100 cem Lösung wurden mit 400 cem Wasser verdünnt und direkt destilliert, das Destillat wurde nach Messiger-Huppert titriert, verbraucht wurden 6.58 cem 1/10 n-Jodlösung.

100 cem Lösung wurden mit 400 cem Wasser verdünnt, destilliert, das Destillat mit Silberoxyd gekocht und destilliert, dieses Destillat titriert; verbraucht wurden 0.78 cem 1/10 n-Jodlösung.

100 cem Lösung wurden mit 400 cem Wasser und Silberoxyd versetzt. Diese Flüssigkeit wurde 1 Stunde am Rückflusskühler gekocht, nach vollständigem Erkalten destilliert und das Destillat titriert. Es wurden 0.70 cem 1/10 n-Jodlösung verbraucht.

100 cem Lösung wurden nach Zusatz von 400 cem Wasser mit Kaliumbisulfitlösung behandelt (30 Minuten stehen gelassen) und nach Ripper titriert. Es wurden 13.89 cem 1/10 n-Jodlösung für die benutzten 20.00 cem  $\text{KHSO}_3$ -Lösung verbraucht.

Titer der benutzten Kaliumbisulfitlösung:

$\text{KHSO}_3$ -Lösung: 1/10 n-Jodlösung  $\equiv$  20.00 cem : 14.82 cem

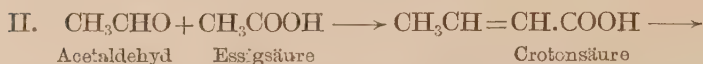
Aldol ist demnach jodbindend und durch Silberoxyd oxydierbar, wird unter der Versuchsbedingung nur träg und wenig vom Kaliumbisulfit gebunden. Diese in einer geringen Masse Kaliumbisulfit bindende Eigenschaft des Aldols spricht kaum gegen die Identität mit der fraglichen Substanz im Durchblutungsfiltrate, sondern vielmehr dafür, wenn man die starke Verdünnung derselben in dem Filtrate in Erwägung zieht. Die jodbindende, durch Silberoxyd zerstörbare Substanz im Durchblutungsfiltrate ist mithin höchstwahrscheinlich Aldol.

Vor kurzer Zeit ist es auch R. Fricke (1922) gelungen, durch Verarbeitung einer grossen Menge sauren Harns von schweren Diabetikern die Anwesenheit von geringen Mengen Aldol nachzuweisen.

Ich habe schon beobachtet, dass bei dem Abbau der Malonsäure ausser Aldol gleichzeitig Acetessigsäure neu gebildet wurde. Diese Tatsache könnte so gedeutet werden, dass zwei Wege beim Abbau der Malonsäure in der Leber vorhanden sind.

1. Die Malonsäure kann sehr leicht durch die Abspaltung

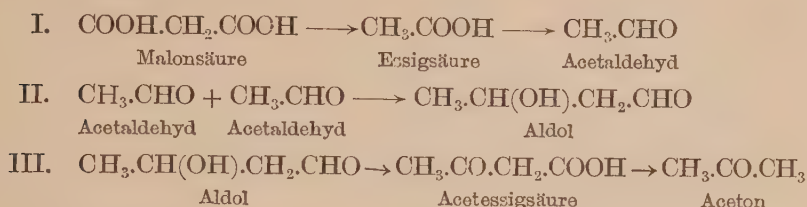
von Kohlensäure in Essigsäure übergehen; die Essigsäure kondensiert, wie Friedmann gezeigt hat, mit intermediär aufgetretenem Acetaldehyd zur Crotonsäure und geht dann in Acetessigsäure über. Dies wird in folgenden Formeln gezeigt:



Dieser Reaktionsmechanismus könnte deshalb mit grösserer Wahrscheinlichkeit in Erwägung gezogen werden, als der von Loeb (vgl. oben A. Loeb und E. Friedmann), weil das Aldol aus der Malonsäure entsteht. Aber die Möglichkeit dieser Reaktionsprozesse sehe ich nur als eine Nebenreaktion an. Wenn die Malonsäure zum grössten Teil auf dem Weg über die Crotonsäure zur Acetessigsäure umgebaut werden kann, so muss man, wie schon erwähnt, eine noch beträchtlichere Entstehung von Acetessigsäure in der Leber beobachten, weil die Crotonsäure nach den Versuchen von Friedmann ein ausgezeichneter Bildner von Acetessigsäure ist.

2. Der Hauptweg des Umbaus der Malonsäure wird zum Aldol führen. In den Resultaten meiner Durchblutungsversuche wurde das Aldol in allen Fällen übereinstimmend von der Malonsäure in beträchtlichem Masse erzeugt und die Acetessigsäure resp. Aceton nur in zwei (Versuch 2 und 6) unter neun Versuchen gebildet. Dies dürfte so zu deuten sein, dass die Essigsäure, die aus der Malonsäure abgebaut werden kann, vielleicht im tierischen Organismus zu Acetaldehyd reduziert werden kann, und dass dann zwei Moleküle Acetaldehyd, wie Friedmann (1908) erstmalig in vivo festgestellt hat, sich zum Aldol kondensieren dürften. Es ist also sehr wohl denkbar, dass ein Teil des Aldols, des Produktes aus Malonsäure, unter physiologischen Bedingungen zu Acetessigsäure zu oxydieren vermag. Diese Reaktionsvorgänge möchte ich

im folgenden Schema zeigen :



Dies weist darauf hin, dass die Essigsäure unter den Versuchsbedingungen des Durchblutungsexperimentes zu Acetaldehyd reduziert werden und auf dem Wege über das Aldol in Acetessigsäure übergehen kann.

Viele frühere Untersuchungen ergaben das Resultat, dass die verschiedenen Arten der Fettsäuren, Aminosäuren und Spaltprodukte von Kohlehydraten im Tierkörper in Acetessigsäure zerlegt werden können, wobei in Betracht gezogen wurde, dass die Essigsäure wahrscheinlich als eine Zwischenstufe bei deren Abbauprozessen intermediär gebildet wird. Die Bildung von Acetessigsäure aus Essigsäure ist aber noch nicht eindeutig festgestellt. Wenn also mein Studium über das Verhalten der Malonsäure in der überlebenden Leber zur Frage der Acetessigsäurebildung aus Essigsäure einen Beitrag geliefert hat, so ist damit gewiss ein Fortschritt erzielt, da der Übergang der Malonsäure zu Acetessigsäure nicht anders als über Essigsäure geschehen kann.

### III. ÜBER DAS VERHALTEN DER D-ZUCKERSÄURE UND D-WEINSÄURE IN DER LEBER.

Ich habe das physiologische Verhalten der Malonsäure, des Anfangsgliedes der Dikarbonsäure, im Tierkörper durch die überlebende Leber untersucht. Nun ist es sehr interessant, die andere Reihe der Dikarbonsäure daraufhin zu studieren, ob sie auch wie die Malonsäure Aldol sowie Acetessigsäure in der Leber bilden kann. Hier wurden zwei Dikarbonsäuren, d-Zuckersäure und d-Weinsäure, ausgewählt und die Durchblutung an der überlebenden Leber von Hunden, welche 24 Stunden gehungert hatten<sup>4</sup>

TABELLE II.

1	2	3	4			5	6
Nummer des Versuch	Glykogengehalt in der Leber		Verbraachte 1/10 n-Jodlösung			Menge von 500 ccm Filtrat des Durchblutes mit Ag <sub>2</sub> O jodbindender Substanz	Menge des pro Liter neugebildeten Blutes Acetons
		Durchblutungsflüssigkeit	a) von 500 ccm Filtrat des Normalblutes direkt destilliert	b) von 500 ccm Filtrat des Durchblutes direkt destilliert	c) von 500 ccm Filtrat des Durchblutes nach Redestillation mit Ag <sub>2</sub> O		
16	% 6.3	2 g d-Zuckersäure mit NaOH neutralisiert 100 ccm physiol. Kochsalzlösung 1400 ccm Rinderblut	ccm 1.16	ccm 2.43	ccm 0.99	ccm 1.44	— —
17	7.1	100 ccm physiol. Kochsalzlösung 6 g d-Zuckersäure mit NH <sub>3</sub> neutralisiert 1400 ccm Rinderblut	0.95	2.79	1.73	1.06	10.46
18	5.3	do	0.80	3.75	2.29	1.46	19.19
19	4.8	do	0.83	1.85	1.00	0.85	2.80
20	6.2	6 g d-Weinsäure mit NH <sub>3</sub> neutralisiert 100 ccm physiol. Kochsalzlösung 1400 ccm Rinderblut	0.70	3.30	2.40	0.90	21.72
21	6.7	do	0.70	4.01	2.23	1.78	19.60
22	4.0	do	0.95	2.61	1.53	1.08	7.97

ausgeführt. Die Technik der Versuche war die gleiche wie in den Versuchen, die ich unter Zusatz von Malonsäure angestellt habe. Unter Berücksichtigung der oben erwähnten Beobachtung von Friedmann, dass nur in glykogenarmen Lebern die Essigsäure Acetessigsäure zu bilden vermag, habe ich in allen Versuchen den Glykogengehalt in der Leber von 24 Stunden hungernden Hunden bestimmt. Vor Beginn der Durchblutung wurde ein Leberlappen abgebunden und die Glykogenbestimmung nach Pflüger ausgeführt. Sämtliche Ergebnisse sind aus der nebenstehenden Tabelle II ersichtlich. Die Versuche wurden immer mit 6 g Substanz, ausgenommen Versuch 16, mit Ammoniak neutralisiert, ausgeführt.

In Tabelle II ist zuerst der Glykogengehalt in der Leber des Hundes nach vierundzwanzigstündigem Hungern gezeigt; er schwankt bei den sieben Versuchen zwischen 4.0–7.1%. Betrachtet man Kolonne 5 und 6 der Tabelle, so sieht man, dass zwischen Zuckersäure und Weinsäure innige Beziehungen bestehen. Die Werte der von den 500 ccm Durchblutungsfiltrat erhaltenen jodbindenden, mit Silberoxyd zerstörbaren Substanzen sind 1.06, 1.46 und 0.85 ccm—ausgenommen Versuch 16—von Zuckersäure und 0.90, 1.78 und 1.08 ccm von Weinsäure. Aus Kolonne 6 ist ersichtlich, dass die Zuckersäure ebenso die Weinsäure in der Leber Acetessigsäure nicht bilden können, während die Malonsäure als Acetessigsäurebildner erkannt wurde. Diese Resultate stehen in Widerspruch mit den Angaben von Masuda (1912), der in 5 Versuchen mit 6 g Zuckersäure 43.0, 67.0, 104.0, 113.0 und 221.0 mg, und mit denen von Ohta (1912), der in vier Versuchen mit 6 g Weinsäure 46.0, 79.0, 90.0 und 93.0 mg neugebildetes Aceton pro Liter Durchblutungsblut gefunden hat. Worauf dieser Widerspruch zwischen den Versuchen der genannten Autoren und meinen eigenen trotz derselben Versuchsbedingungen zurückzuführen ist, kann ich nicht sagen, ich möchte hier nur an die frühere Arbeit von J. Wirth (1911) erinnern und seine Versuche mit Zuckersäure zum Vergleich heranziehen. Wie in seiner Tabelle III ersichtlich, sind die neugebildeten Acetonmengen in den sechs Versuchen—

Versuch 6 und 10 wurden wegen der darin vorgekommenen Störungen ausgenommen—39.0, 52.0, 53.0, 55.0, 73.0 und 89.0 mg pro Liter Blut. In diesen Zahlen sind vielleicht die Werte der jodbindenden, mit Silberoxyd zerstörbaren Substanz zusammen enthalten. Wenn man also diese Werte, auch wenn sie sehr gering sind, von der von Wirth angegebenen Acetonmenge abzieht, so sieht man, dass die Zuckersäure in diesen Versuchen den Umfang der Acetessigsäurebildung nicht merklich steigert.

Jedenfalls vermochten nach meinen Versuchen d-Zuckersäure und d-Weinsäure bei der überlebenden Leber Acetessigsäure nicht zu bilden.

Wenn man die oben erwähnte jodbindende, mit Silberoxyd zerstörbare Substanz, die von Zuckersäure sowie Weinsäure stammte, als Aldolbildung betrachten darf, so wird vielleicht die Annahme berechtigt sein, dass der Weg zum Aldol über Essigsäure bzw. Acetaldehyd führt; aber das Vermögen der Aldolbildung ist dabei sehr schwach.

Den Unterschied, der zwischen Malonsäure und Zuckersäure sowie Weinsäure besteht, können wir neben diesem physiologischen Verhalten in der isolierten Leber auch bei den klinischen Erfahrungen konstatieren. Bei den diabetischen Krankheiten ist die Bedingung für das Auftreten der Acetonkörper die Kohlehydratkarenz. Kohlehydrate wirken also der Bildung der Acetonkörper entgegen. Ebenso wirken auch andere im Organismus leicht verbrennbare Substanzen antiketogen. L. Schwarz (1900) hat bemerkt, dass die Verfütterung von Zuckersäure bei Diabetikern eine Herabsetzung der Acetonkörperausscheidung bewirkt. G. Satta (1905) hat an einem mit einseitiger Kost (Fett und Fleisch) genährtem Mann beobachtet, dass per os eingeführte Weinsäure die Acetonkörper verminderte. Malonsäure aber hat umgekehrt auf die Acetonkörperausscheidung eine progressiv vermehrende Wirkung ausgeübt. J. Baer und L. Blum (1907) haben beim phloridzindiabetischen Hund auch bemerkt, dass irgend eine Beeinflussung der Acetonausscheidung durch die Malonsäure nicht vorhanden ist.

Auch die Ergebnisse der Durchblutungsversuche, welche an der Leber mit verschiedenartigen Substanzen von Embden und seinen Mitarbeitern (1906) ausgeführt wurden, stimmen mit den Resultaten der Untersuchungen an schweren Diabetikern von Baer und Blum (1906) darin überein, dass die Substanzen, die in den isolierten Lebern Aceton bilden, bei schweren Diabetikern die Acetonausscheidung vermehren, und dass diejenigen, die in der Leber bei der Durchblutung nicht zur Acetessigsäure umgebaut werden, bei den Diabetikern die Acetonkörperausscheidung verhindern.

Und weiter vermag nach Embden und Wirth (1910) auch im Leberdurchblutungsversuche der Zusatz von Valeriansäure, die keine Quelle der Acetonkörper ist, zur Durchblutungsflüssigkeit die Acetessigsäurebildung aus Kapronsäure zu hemmen.

Obgleich unsere Kenntnis darüber, wie die Substanzen antiketogen wirken, noch nicht ganz geklärt ist, ist doch anzunehmen, dass die im Durchströmungsversuche als Acetonbildner erkannten Substanzen tatsächlich im intermediären Stoffwechsel in weitem Umfange als Bildner von Acetonkörpern anzusprechen sind, und dass die im klinischen Bild antiketogen wirkenden Substanzen im Durchblutungsversuche kein Aceton neugebildet haben.

Aus diesem Grunde wird auf das Resultat meiner Versuche hinzuweisen sein, dass bei der Durchblutung in der isolierten Leber die Malonsäure Acetessigsäure bildet, umgekehrt aber die Zuckersäure und Weinsäure nicht.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

Die Malonsäure kann bei der Durchblutung in der überlebenden glykogenarmen Hundeleber neben Aceton, wenn auch unregelmässig, nicht unbeträchtliche Mengen einer jodbindenden flüchtigen Substanz, die durch Silberoxyd zerstört wird, bilden lassen.

Diese Substanz ist aller Wahrscheinlichkeit nach Aldol.

Den Übergang von Malonsäure in Acetessigsäure kann man nur durch das intermediäre Auftreten von Essigsäure erklären.

Für das weitere Uebergehen dieser Essigsäure in Acetessigsäure bestehen zwei chemische Möglichkeiten.

Die Essigsäure kondensiert sich mit intermediär aufgetretenem Acetaldehyd zu Crotonsäure; die Crotonsäure geht auf dem Weg über die  $\beta$ -Oxybuttersäure in Acetessigsäure über. Aber die Möglichkeit dieser Reaktionsprozesse ist m. E. eine Nebenreaktion.

Der Hauptweg des Umbaues der Essigsäure kann zum Aldol führen; Aldol geht in Acetessigsäure über, denn die intermediäre Crotonsäurebildung bei der Durchblutung der Malonsäure ist durch meine Versuchen höchst unwahrscheinlich gemacht.

Die Aldolbildung aus Malonsäure bietet einen Hinweis darauf, dass die Essigsäure im tierischen Organismus zu Acetaldehyd reduziert werden kann.

d-Zuckersäure und d-Weinsäure vermögen in der isolierten glykogenarmen Leber Acetessigsäure nicht zu bilden.

Nach Durchblutung mit d-Zuckersäure sowie d-Weinsäure lässt sich eine jodbindende, mit Silberoxyd zerstörbare Substanz nachweisen. Diese Substanz ist vielleicht auch Aldol, aber die gebildete Menge ist sehr gering.

Die Ergebnisse bei der Durchströmung mit Malonsäure und Zuckersäure sowie Weinsäure stimmen mit den Resultaten der von früheren Autoren ausgeführten Stoffwechselversuche an schweren Diabetikern überein.

Die Untersuchung wurde im Laboratorium der I. med. Klinik der Kgl. Charité zu Berlin unter Leitung von Professor E. Friedmann ausgeführt. Wegen des plötzlichen Ausbruches des Weltkrieges musste ich das Untersuchungsprotokoll dort liegen lassen. Erst neulich konnte ich es wieder in meine Hand bekommen. Somit erlaube ich mir die ganzen Untersuchungsergebnisse zusammengestellt zu publizieren, indem ich den ersten Teil, Versuche mit Malonsäure, wieder rekapituliere, welche schon vorläufig (damals bin ich über die Natur der jodbindenden flüchtigen Substanz noch zu keinem abschliessenden Urteil gekommen) kurz berichtet wurden.

## LITERATUR

- Baer, J. und Blum, L. (1906): Arch. f. experim. Pathol. u. Pharm., **55**, 94.  
Baer, J. und Blum, L. (1907): Beitr. chem. Physiol. u. Pathol., **10**, 84.  
Battelli, F. und Stern, L. (1911): Biochem. Z., **30**, 172.  
Embden, G., Salomon, H. und Schmidt, F. (1903): Beitr. chem. Physiol. u. Pathol., **8**, 129.  
Embden, G. und Wirth, J. (1910): Biochem. Z., **27**, 1.  
Embden, G. und Oppenheimer, M. (1912): Biochem. Z., **45**, 186.  
Fricke, R. (1922): Zeitschr. f. physiol. Chem., **113**, 218.  
Friedmann, E. (1908): Beitr. chem. Physiol. u. Pathol., **11**, 202.  
Friedmann, E. (1908): Beitr. chem. Physiol. u. Pathol., **11**, 371.  
Friedmann, E. (1913): Biochem. Z., **55**, 436.  
Loeb, A. (1912): Biochem. Z., **47**, 118.  
Masuda, N. (1912): Biochem. Z., **45**, 140.  
Ohta, K. (1912): Biochem. Z., **45**, 167.  
Pohl, J. (1896): Arch. f. experim. Pathol. u. Pharm., **37**, 413.  
Satta, G. (1905): Beitr. chem. Physiol. u. Pathol., **6**, 376.  
Schwarz, L. (1900): Centralbl. f. Stoffw. u. Verdauungskkrankh., **1**, 1.  
Wirth, J. (1911): Biochem. Z., **33**, 49.



# CHEMICAL STUDIES ON HEMATOPORPHYRIN RABBITS.

## II. The Relationship Between Anemia and Fibrinogen Content of Blood.

By

KICHIYA OHTA.

*(From the Biological Laboratory, Institute of Medical Chemistry, Tokyo  
Imperial University. Director: Prof. S. Kakiuchi.)*

(Received for publication, September 5, 1924.)

### I. INTRODUCTION.

In the previous paper it was pointed out by the author (1924) that in the blood of hematoporphyrin rabbits exposed to the sun light the amount of erythrocytes and hemoglobin were decreased, while at the same time the contents of fat and fibrin were increased. As it seemed to me interesting to find out whether or not the decrease of erythrocytes and the increase of fibrinogen have any direct causal relationship this research has been undertaken.

It is a known fact that anemia is accompanied with a certain degree of increase in the amount of fibrinogen of blood. The increase of fibrinogen in our case may, therefore, be induced only as the effect of anemia caused by hematoporphyrin. It is, however, also possible that the increase of fibrinogen is a direct result of the action of hematoporphyrin on the animal and appears together with anemia. To decide this point anemia was produced by successive bleedings on rabbits and the grade of fibrinogen increase in these cases was compared with that of hematoporphyrin animals.

TABLE I.

The weight of rabbits: No. 2 = 2460gm.; No. 3 = 2620gm.

Date	No. 2 ♂				No. 3 ♂			
	Blood drawn	Number of erythrocytes per cmm.	Hemoglobin per 100 ccm blood	Fibrin N per 100 cc. plasma	Blood drawn	Number of erythrocytes per cmm.	Hemoglobin per 100 ccm blood.	Fibrin N per 100 cc. plasma
1923	cc.	mill.	gm.	gm.	cc.	mill.	gm.	gm.
28. Nov.	12	4.7	10.1	0.0504	12	5.1	11.5	0.0588
29	"	4.5	8.6		"	4.0	8.4	0.0701
30	"	4.0	7.9	0.0672	"	4.0	8.6	0.0799
1. Dec.	"	3.7	7.9	0.0672	"	3.3	7.4	0.0729
2	10	3.8	8.1		10	3.0	6.5	0.0504
3	"	3.0	7.2		"	2.5	6.2	
5	8	3.7	8.1	0.0578	8	2.4	6.2	0.0518
6	"	4.1	8.6		"	3.0	6.7	0.0603
7	10	3.8	8.9		10	2.8	6.7	0.0616
8	8	3.4	8.4		8	2.1	7.3	0.0616
9	"	3.3	7.2	0.0799	"	3.0	7.3	0.0588
10	"	3.4	7.2	0.0897	15	4.1	6.9	0.0701
12	10	3.5	7.9	0.0737	10	3.8	7.4	0.0644
13	"	3.7	7.9	0.0686	"	4.1	7.4	0.0588
14	12	4.4	7.2		"	3.7	7.4	
15	"	3.4	8.1	0.0803	12	4.2	8.4	
16	"	3.4	6.9	0.0546	"	3.8	7.4	
17	"	3.9	7.2	0.0546	"	3.6	7.2	
19	20	4.0	8.6		20	3.7	8.1	0.0588
20	"	4.0	7.2	0.0546	"	3.2	7.2	
21	30	3.4	6.9	0.0588	40	2.9	6.7	0.0630
22	10	3.2	7.2	0.0504	12	2.1	5.3	0.0771
23	13	2.7	7.2	0.0644	9	2.2	5.0	0.0757
24	10	3.0	7.4	0.0616	"	2.6	6.0	0.0771
25	"	3.8	7.7	0.0630	"	3.1	6.9	0.0588
26	"	3.9	8.4	0.0588	10	3.3	8.1	0.0729
30	"	4.8	10.1	0.0574	"	5.1	10.1	0.0532
1924								
23. Jan.	12	6.0	12.5	0.0532	12	6.3	12.3	0.0771
15. Feb.	"	6.0	12.7	0.0574	"	6.3	12.3	0.0672

## II. THE AMOUNT OF FIBRINOGEN AND ERYTHROCYTES IN THE BLOOD OF RABBITS BY THE SUCCESSIVE BLEEDINGS.

The albino rabbits weighing between 2 and 3 kg. were fed every afternoon with 10% their body weights of "Okara" and 5% of green vegetables. Early in the morning after the count of red blood cells and the determination of hemoglobin contents were taken in each animal, about 12 cc. of the blood was taken out by means of a syringe, loaded with 0.06 gm. of powdered potassium oxalate, from the marginal ear vein, which was made hyperemic with the previous application of xylene. The plasma was then separated from the blood corpuscles by a centrifuge and 5 cc. of it were used for the determination of fibrinogen by the method of Cullen and Van Slyke (1920). Whenever the clotting of blood in the syringe occurred the determination was naturally broken off. The results of these determinations are shown by the examples of 2 cases in the preceding table.

As this table indicates, the increase of fibrinogen was not so obvious, although the number of erythrocytes decreased sometimes to a half of their normal value.

The amount of erythrocytes and fibrinogen in the blood of a hematoporphyrin rabbit on the other hand was found in the previous experiment to be as follows.

TABLE II.  
Average of several experiments.

Condition	Number of erythrocytes per cmm.	Fibrin N per 100 cc. plasma
normal rabbit	<i>mill.</i> 6.2	<i>gm.</i> 0.058
hematoporphyrin rabbit	5.1	0.135

If we compare these two tables it can be clearly understood that the anemia alone can not be accounted for by the increase of fibrinogen contents in hematoporphyrin animals, and that the anemia and fibrinogen increase appear as the concurrence in the hematoporphyrin rabbit.

### III. SUMMARY.

The anemia and the increase of fibrinogen amount in the blood of hematoporphyrin rabbit exposed to the sun light ought to be interpreted as the concurrent phenomena.

The writer wishes to thank Professor S. Kakiuchi for advice throughout the course of the investigation.

### REFERENCES.

- Cullen, E. and van Slyke, D. (1920): *Journ. biol. chem.*, **41**, 587.  
Ohta, K. (1924): *Journ. of Biochem.*, **4**, 225.

# CHEMICAL STUDIES ON HEMATOPORPHYRIN RABBITS.

## III. The Fibrinogen Contents of the Blood of Hematoporphyrin Rabbits.

By

KICHIYA. OHTA.

*(From the Biological Laboratory, Institute of Medical Chemistry, Tokyo  
Imperial University. Director: Prof. S. Kakiuchi.)*

(Received for publication, September 5, 1924)

### I. INTRODUCTION.

In the preceding papers (Ohta 1924, 1925) it was pointed out that the fibrinogen contents of the blood of hematoporphyrin rabbits exposed to the sun light was increased to a great amount and this increase was not entirely due to the anemia simultaneously observed in the animal. In the following pages it is desired to report some results of experiments which show the course of fibrinogen increase and decrease in the hematoporphyrin animal.

In following the daily change in the fibrinogen content of hematoporphyrin rabbit it is quite necessary to use the possible small amount of blood in the determination of fibrinogen to avoid anemia by daily bleeding. For this purpose the following method of fibrinogen determination seems to be quite reliable.

### II. THE DETERMINATION OF FIBRINOGEN.

1 cc. of the plasma obtained by means of a centrifuge from 3 cc. of the oxalated blood was introduced into a tube of a centrifuge, which contained previously 10 cc. of 0.8% NaCl, added with 1 cc. of 2.5 g/dl  $\text{CaCl}_2$  and stirred very vigorously. After

about an hour the mixture was centrifuged, the supernatant fluid was pipetted off and 10 cc. of 0.8% NaCl were again added to disintegrate the fibrin precipitate quite thoroughly.

This precipitation and washing were repeated four times to get rid of the impurity which might have contaminated the fibrin. After the third time of washing the wash water indicated no trace of protein by hydroferrocyanic acid reaction. When the fifth washing was completed the tube was inserted into a boiling water bath for a few minutes. By this means the fibrin shrank to a compact mass and could easily be transferred into a micro-kjeldahl tube for further treatment. The fibrin contents were calculated from the result of the microkjeldahl. This micromethod was found to have almost the same accuracy as in the macromethod of Cullen and Van Slyke (1920).

Some data obtained from some blood plasma by the macro- and micromethod are compared in the following table.

TABLE I.  
Fibrin N per 100 cc. plasma.

No. of plasma	by Cullen and van Slyke's method	by the present micro-method with 0.5cc. plasma	micro-method with 1cc. plasma
1	0.0588		0.0584
2	0.0560	0.0553	0.0595
3	0.0743	0.0739	0.0696
4	0.0644	0.0635	0.0616

0.5 cc. of plasma may be used instead of 1 cc. without much loss in accuracy.

### III. THE PROCEDURE OF THE EXPERIMENT.

3 rabbits weighing about 2 kgm, were fed with the same diet as reported in the foregoing experiment. On the third day of the feeding the count of blood cell, hemoglobin content and fibrin amount were determined.

On the fourth day after the blood for the determination of blood corpuscles, hemoglobin and fibrinogen had been taken a certain amount of hematoporphyrin corresponding 0.5gm. per kgm.

body weight was injected subcutaneously and placed in a sunny place for from 2.5 to 4 hours. On every succeeding day the blood determination and the exposure to the sun light were repeated for about three weeks and the last blood determination was also performed at the end of the fourth week.

At the same time a control experiment was undertaken with two rabbits, in which 3 cc. of blood were taken out every day and the same determinations as those of the main experiment. This control experiment had the purpose to find out whether or not there were some changes in the number of erythrocytes, hemoglobin contents or fibrin amount observed during the successive daily bleeding of 3 cc. of blood.

#### IV. THE RESULTS.

In the following tables the results of the experiment together with those of the control experiment are shown:

TABLE II.

The effect of the successive bleeding of 3 cc. of blood.

Date 11/III-30/III 1924	Rabbit No. 1.			Rabbit No. 2.		
	No. of erythrocy. per cmm.	Hemoglo- bin per 100 cc. blood	Fibrin N per 100 cc. plasma	No. of erythrocy. per cmm.	Hemoglo- bin per 100 cc. blood	Fibrin N per 100 cc. plasma
	<i>million</i>	<i>gm.</i>	<i>gm.</i>	<i>million</i>	<i>gm.</i>	<i>gm.</i>
1	6.0	13.4	0.0827			
2	5.8	12.7		7.0	13.7	0.0729
3	5.8	12.9	0.0855	5.9	13.2	0.0869
4	6.3	13.2	0.0644	6.7	13.4	0.0827
6	5.9	12.5	0.0630	6.7	13.9	0.0757
7	6.2	14.4	0.0588	6.1	14.4	0.0686
8	6.0	12.2	0.0658	6.1	13.9	0.0672
9	6.0	12.7	0.0672	6.2	13.9	0.0771
10	5.1	12.3	0.0686	6.3	12.9	
11	5.9	12.2	0.0616	5.9	12.7	0.0644
13	6.0	12.7	0.0546	6.0	13.2	0.0532
16	5.3	13.2	0.0560	6.0	13.4	0.0630
20	5.3	13.2	0.0490	6.0	14.4	0.0518

TABLE III.

Hematoporphyrin was injected on the second day of the experiment.

Date	Time of exposure to sun light	Rabbit No. 3.			Rabbit No. 4.			Rabbit No. 5.		
		Number of erythrocy. per cmm	Hemoglo- bin per 100 cc. blood	Fibrin N per 100 cc. plasma	Number of erythrocy. per cmm	Hemoglo- bin per 100 cc. blood	Fibrin N per 100 cc. plasma	Number of erythrocy. per cmm	Hemoglo- bin per 100 cc. blood	Fibrin N per 100 cc. plasma
	hour	million	gm.	gm.	million	gm.	gm.	million	gm.	gm.
1		5.6	14.6	0.0574	6.3	14.6	0.0504	7.2	13.4	0.0630
2	3	6.2	12.0	0.0686	6.1	12.7	0.0560	7.1	11.5	0.0729
3	rainy	6.1	12.5	0.1345	5.8	12.5	0.1079	5.9	12.9	0.1149
4	5	4.7	11.5	0.1275	5.1	13.7	0.0939	6.4	14.6	0.1051
5	5									
6	5	5.0	9.8	0.0883	4.9		0.1191	4.3	11.7	0.1499
7	5	4.7	10.1	0.0965	5.6	10.1	0.081	4.7	10.1	0.1233
8	5	4.8	10.1	0.0953	5.0	10.5	0.0743	4.4	9.8	0.1009
9	5	4.6	9.8	0.1009	4.1	10.3	0.0855	3.9	9.6	0.1023
10	5	4.7	9.8	0.1079	4.5	9.8	0.0813	4.0	9.3	0.0953
11	cloudy	4.8	9.8	0.1069	5.5	10.1	0.0729	4.9	9.1	0.0897
12	5									
13	5	5.0	9.3	0.0841	5.5	10.1	0.0658	4.7	9.3	0.0855
14	5									
15	5									
16	rainy	5.3	9.6	0.0911	6.1	11.3	0.0813	5.2	10.8	0.0925
17	cloudy									
18	5									
19	5									
20	5	6.2	12.2	0.0616	6.9	14.6	0.0897	5.8	12.9	0.0729
27		6.1	12.2	0.0476	5.9	12.5	0.0532	5.1	12.0	0.0630

## Chemical Studies on Hematoporphyrin Rabbits. 471

From table II it is clearly shown that the successive bleeding of 3 cc. of blood has scarcely an effect on the amount of erythrocytes, hemoglobin and fibrinogen. On the other hand, as table III indicates, the fibrinogen content of the blood increases quite rapidly after the injection of hematoporphyrin succeeded by exposure to the sun light. This increase of fibrinogen appears early in the days when the decrease of erythrocytes and hemoglobin is not so remarkable (the second days of the experiment). The normal condition comes back slowly in the course of about four weeks.

### SUMMARY.

The daily change of amount of erythrocytes, hemoglobin and fibrinogen of the hematoporphyrin rabbit exposed to sun light was followed.

The writer wishes to thank Professor S. Kakiuchi for advice throughout the course of the investigation.

### REFERENCES.

- Cullen, E. and Van Slyke, D. (1920): *Journ. biol. chem.*, **41**, 587.  
Ohta, K. (1924): *Journ. Bioch.*, **4**, 225.  
——— (1925): *Journ. Bioch.* **4**, 464.



# A REVISED TITRIMETRIC METHOD OF ESTIMATING CO<sub>2</sub> IN SMALL AMOUNT.

By

S. NISHI.

(From the Ōtsu Hydrobiological Station, Kyōto Imperial University.  
Under the direction of Prof. R. Shoji of the  
Institute of Physiology)

(Received for publication, October 30, 1924.)

## I. INTRODUCTION.

For the purpose of estimating CO<sub>2</sub> contained in small amount in a gas, Warburg's titrimetric method (1909) has widely been believed to be the most accurate one. The principle of his method is that CO<sub>2</sub> to be analysed is absorbed in a solution of barium hydroxide of a known concentration at 70° or 80°C and then the remaining Ba(OH)<sub>2</sub> is titrated in the presence of BaCO<sub>3</sub> precipitate, using phenolphthalein as indicator. The whole procedure is necessarily carried on in CO<sub>2</sub>-free atmosphere.

In this method I found a source of serious error. The solubility product of BaCO<sub>3</sub> is very small ( $1.9 \times 10^{-9}$  at 16°C) and consequently the concentrations of CO<sub>3</sub>'' and of HCO<sub>3</sub>' in the baryta solution after absorption are negligibly minute, so long as the solution remains strongly alkaline. When we neutralize the solution by titration, however, the equilibrium of the following reactions



and



displace towards left side, so that a part of CO<sub>2</sub> for estimation is driven away in gaseous form out of the solution. The velocity of redissolution of the BaCO<sub>3</sub> precipitate is rather slow, so that

the end point of the titration varies depending upon the rate of addition of the acid.

Then I (1925) came to a new method, the principle of which is to filter off the  $\text{BaCO}_3$  precipitate out of the solution before titration. For this purpose I composed a new arrangement, details of which were already reported. The difficulty of this method is, however, in the procedure of filtration, which is of course to be carried on in a  $\text{CO}_2$  free medium. If a trace of the precipitate escapes through the filter, it will cause an error in the final titration.

Now I have devised another new method in which the filtration is avoided. The principle of this second method is this that the  $\text{CO}_2$  gas to be analysed is absorbed in a  $\text{NaOH}$  solution of a known concentration, and the remaining alkali is titrated directly in the presence of  $\text{CO}_2$  absorbed in the solution. For the titration a suitable indicator must be used, to titrate the rest of  $\text{NaOH}$ , but not the bicarbonate coming from absorbed  $\text{CO}_2$ .

It is reasonable to believe that practically all  $\text{CO}_2$  absorbed in a  $\text{NaOH}$  solution exists in the form of bicarbonate, as far as the solution is still strongly alkaline.



Suppose that the remaining  $\text{NaOH}$  is perfectly neutralized, then the bicarbonate will undergo hydrolysis,



and the reaction will be weakly alkaline. In practical estimation we use  $\text{N}/50$   $\text{NaOH}$ . Therefore we will calculate here pH of a  $\text{N}/50$  bicarbonate solution.

The degree of hydrolysis  $x$  of a salt consisting of a weak acid and a strong base is expressed by

$$x = \sqrt{\frac{K_w}{K_a} \cdot v}$$

in approximation, where  $K_a$  being the equilibrium constant of the

acid,  $K_w$  the ionic product of water and  $v$  the dilution of the solution. Its OH-ion concentration is represented approximately by the following expression.

$$[\text{OH}'] = [\text{H}_2\text{CO}_3] = \frac{x}{v} = \sqrt{\frac{K_w}{K_a v}},$$

and

$$[\text{H}'] = \frac{K_w}{[\text{OH}']} = \sqrt{K_w K_a v}.$$

or

$$P_H = -\frac{1}{2} \log (K_w K_a v)$$

where  $K_a = 3.0 \times 10^{-7}$  at 18°C for  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3'$ ,

$$K_w = 0.73 \times 10^{-14} \text{ at } 18^\circ\text{C},$$

and

$$v = 50 \text{ for } \frac{1}{50} \text{ N Solution.}$$

From this equation we calculate

$$\text{pH} = 9.48 \text{ for } 1/50 \text{ N NaHCO}_3 \text{ solution.}$$

Therefore, if we titrate a mixture of N/50 NaOH and NaHCO<sub>3</sub> using an indicator which changes its colour at a pH which is adjacent to 9.5, NaOH in the solution can be titrated without being disturbed by the existence of bicarbonate.

For this purpose I tried the following six indicators, namely, Phenolphthalein, Thymolphthalein, Tropaeolin 0, Arizalin yellow, Tropaeolin 000I, Trinitrobenzol, and found that only Thymolphthalein is quite satisfactory. This was tested by the following preliminary experiments. 5 cc. of 1/50N NaOH solution was added with various amount of 1/50N NaHCO<sub>3</sub> solution and then it was titrated with 1/50N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Each titration was confirmed by double or triple estimations.

TABLE I.

N/50 NaOH + N/50 NaHCO <sub>3</sub> taken		N/50 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> required	Indicator
5.00 cc.	0(5.00 cc. H <sub>2</sub> O)	5.00	Thymolphthalein (0.5% in 50% alcohol) 2 gtt.
"	1.00	5.00	
"	3.00	5.00	
"	5.00	5.00	
"	6.00	5.00	
"	7.00	5.00	
"	8.00	4.88	
"	10.00	4.95	
"	15.00	4.91	
"	0(5.00 cc. H <sub>2</sub> O)	5.00	Phenolphthalein (1% in 50% alcohol) 2 gtt.
"	0.50	5.05	
"	1.00	5.10	
"	3.00	5.20	
"	0(5.00 cc. H <sub>2</sub> O)	4.85	Trinitrobenzol (1% in 50% alcohol) 5 gtt.
"	5.00	3.19	

With other three indicators, the endpoint was very obscure, so that they did not change colour distinctly with the last drop of the acid.

From above experiments it is known that as far as the amount of the bicarbonate exceeds very much that of the base, the result is quite satisfactory with Thymolphthalein, but not with the other indicators.

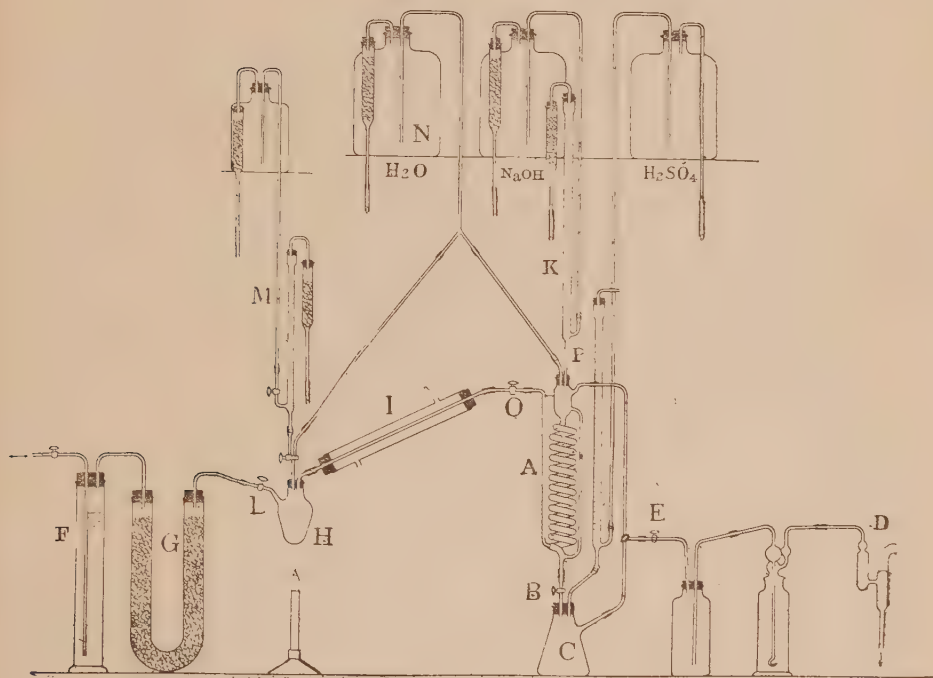
By potentiometry it was found that the value of pH, at which Thymolphthalein shows its blue colour slightly but perceptibly, is 9.78, which exceeds slightly that of N/50 NaHCO<sub>3</sub> solution, namely 9.48.

## II. ARRANGEMENT OF THE ESTIMATION.

The whole arrangement is described in the figure. A is the absorption tube composed of a spiral glass tubing of about 20 c.c. content, the upper end of which being widened to a capacity of

about 25 c.c. A side tube opens at the lower end of the spiral from which the gas for analysis is to be bubbled into the spiral tube. Another side tube connects the upper and lower part of

Fig. 1.



the spiral tube, the latter being situated lower than the bubbling opening. This serves to circulate the liquid in the tube when bubbled. The lower end of the absorption tube is lead by insertion of a tap B to an Erlenmeyer flask C of about 200 c.c content in which the titration is carried out. Gaseous content of the absorption tube and the titration flask is sucked at will by means of a water pump D through two wash bottles, which prevent the titration flask from back flow of water. The speed of the suction can be adjusted by means of a tap E. F is a cylinder

containing a concentrated Soda solution and G a soda-lime tube by means of which the  $\text{CO}_2$ -free air is supplied. The bottle H of some 30 cc. content and the cooler I is the arrangement for estimating  $\text{CO}_2$  content of a solution. They must be replaced with another arrangement, when a gas is to be analysed, which will be described later.

Now we will describe the procedure of estimating  $\text{CO}_2$ -content in a solution. First an amount of dilute  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , which is sufficient to drive out all  $\text{CO}_2$  contained in a certain amount of the solution for analysis, is put in the bottle H, and then it is stoppered as is described in the figure. On the other hand a few drops of Thymolphthalein (0.5% in 50% alcohol solution) is put in the titration flask C. Then, by suction with water pump, the internal space of the whole arrangement is thoroughly washed with  $\text{CO}_2$  free air. In this process, the absorption tube A and the titration flask C must be washed separately by adjusting the taps B and J suitably. Washing for 20 minutes is enough, when 100-150 c.c. of the  $\text{CO}_2$ -free air is sucked per minute. Now the suction is stopped, and 20 cc. of N/50 NaOH solution is put into the absorption tube A from the burette K, the tap B being closed. Next the tap L is shut, and then a measured amount of the solution for analysis is poured from the burette M into the bottle H. The solution in the tubing below the tap of the burette M is washed down with  $\text{CO}_2$  free water stored in the bottle N. On adding the solution into the acid in the bottle H,  $\text{CO}_2$  gas is set free and some gas bubbles into the absorption tube. Now the content of the bottle H is gently boiled to drive away all  $\text{CO}_2$  from the solution. The cooler I serves to prevent any loss of water from the boiling solution. When the boiling solution is cooled by chance, there is a danger of the alkali flowing back into the cooler. To prevent this danger, the tap O should be closed at once. While the solution is being boiled gently, suction is applied to the absorption tube a and then the tap L is opened slowly to drive all gaseous content containing  $\text{CO}_2$  into the absorption tube. Washing per 15 minutes is quite sufficient for

this purpose, when about 30 cc. is sucked per minute. Now the tap B is opened and the whole content in the absorption tube A is transferred into the titration flask, and the absorption tube is washed three times with CO<sub>2</sub>-free water, which is added to the alkali in the titration flask. The transference of the content is easily attained by applying gentle suction on the titration flask. At last the content of the titration flask is titrated with N/50 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution from another burette P.

When a gas is to be analysed, the soda-lime tube G and the absorption tube A should be connected in two ways. One way is to connect the two directly, to serve for previous washing of the arrangement. The other is to connect G with the bottom of the gas-container and also to connect its upper opening with the absorption tube A, which serves to drive the whole gas for analysis through the absorption tube.

### III. ACCURACY OF THE METHOD.

In order to test the accuracy of the method, a solution containing a known amount of CO<sub>2</sub> was analysed. For this purpose I prepared 0.750 g/L solution of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The carbonate was prepared by igniting pure bicarbonate (zur Analyse, Kahlbaum). The results obtained are given in the following table. Each estimation was repeated ten times and its mean with probable error is given here.

TABLE II.

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> solution (0.750 g/L)	CO <sub>2</sub> content		Difference
	Calculated	(means of 10 estimations)	
cc.	mg.	mg.	mg.
1.00	0.3113	0.3686 ± 0.0093	+ 0.0573
2.00	0.6226	0.6193 ± 0.0066	- 0.0033
3.00	0.9340	0.9513 ± 0.0045	+ 0.0173
5.00	1.5566	1.5971 ± 0.0061	+ 0.0405
7.00	2.1792	2.2132 ± 0.0030	+ 0.0340
10.00	3.1132	3.1407 ± 0.0060	+ 0.0275

As is seen in the table, the probable error does not exceed 0.01 mg. But there is a systematic error of +0.03 mg. in average.

#### SUMMARY.

The principle of the new method of estimating a small amount of  $\text{CO}_2$  reported here, is to absorb  $\text{CO}_2$  in a  $\text{NaOH}$  solution of known concentration, and to titrate the rest of the alkali with a standard acid solution in existence of bicarbonate formed in the solution, Thymolphthalein being used as indicator.

#### REFERENCES.

- Nishi (1925): *Acta Sch. Med. Kyoto*. **7**. No. 3.  
Warburg (1909): *Z. physiol. Chem.* **61**, 261.

# STUDIES ON THE RAT CARCINOMA.

By

MASAO IWANO.

*(From the Biochemical Laboratory, Institute of Medical  
Chemistry, Tokyo Imperial University.*

*Director: Prof. S. Kakiuchi).*

(Received for publication, June 10, 1924),

## I. INTRODUCTION.

Robertson, T. B. and Burnett, T. C. (1913) have postulated a theory that lecithin inhibits the growth of tumor, while cholesterol stimulates it. The latter fact has been confirmed by Sweet, Carson-White and Saxon (1915). Luden, G. (1916) reports that high cholesterol value has been found in the blood of patients suffering from malignant-tumors.

Though all these facts tell us explicitly that the fatty substances play an important role in the chemisms involved, the present state of our knowledge in this respect is very meagre and it urges the writer to study the relation more thoroughly. Some attention on the takes of the tumor under various conditions was also paid in our experiments. Though it appears not to be allowed to promote any theory on the basis of these scarce experimental data, it is not less important to survey the phenomena observed and to give possible explanations for it.

The experiments were carried out on rat carcinom (Flexner-Jobling), which was delivered from the Institute of Infection-disease, Tokyo.

## II. METHOD.

### 1. *Inoculation of the tumor into the rats.*

The tumor was taken out and freed as completely as possible

from the surrounding tissues. It was then washed with sterilized 0.8% NaCl-solution, cut into small pieces with the help of scissors and washed 3 times more with NaCl-solution. The suspension of the tumor tissue thus treated was made with NaCl-solution, 0.4 cc. of such tumor suspension was injected into the subcutaneous tissue of normal rat.

## 2. *Measurement of the body weight of rats and the size of tumors.*

As a rule, the body weight was measured weekly, but the underfed rat was weighed daily for the first week.

The size of tumors was measured in length and breadth every two days after they grew so large as to be able to ascertain their existence with the finger.

## 3. *Feeding.*

The normal ration consists of unpolished rice, vegetable, water and common salt, but in the case of underfeeding the amount of rice is reduced according to the body weight of the animals. For example, to the rats weighing less than 80-90 grams the amount of rice corresponding to  $\frac{1}{12} - \frac{1}{20}$  of the body weight was given; to those weighing more,  $\frac{1}{20} - \frac{1}{25}$  of their body weight.

## 4. *Methods of analysis of the tumors.*

The tumor taken out was freed from all other tissues on its surface, cut into small pieces and ground in mortar. About 1-1.5 gm. of the tumor pulp was then weighed in a beaker of known weight, covered with 2 times its volume of absolute alcohol, dried at 100°C in a drying-closet to constant weight. After weighing in the coolness, the dried tumor tissue was placed as completely as possible in a paper-case, which was made of the fat-free filter paper and filled with fat-free cotton on its bottom.

In order to extract completely the fatty substances adhering to the wall of the beaker, about 5-10 cc. of alcohol-ether mixture

(3:1) was poured into the beaker, and after rubbing off the adherent mass with the aid of a spatula, this beaker was heated in the water-bath to boiling and then the content of the beaker was filtered off through a fat free filter paper (5 cm. diameter). The same operation was repeated 3 times. The filter paper was then folded together, placed in the same paper-case, which was used for alcohol-ether extraction, and extracted in Kumagawa-Suto's extractor with 25 cc. absolute alcohol at 100°C for 7-8 hours. After a certain hour of the hot alcohol extraction, the paper-case was transferred into a Soxhlet ether extractor of the small size and extracted at 60-70°C with ether for 7 hours. Both extracts were then completely poured into the alcohol-ether extract above obtained and filled to 100-150 cc. volume by adding the alcohol-ether mixture. A given portion of the extraction mixture was used for the following determination.

1) *For lecithin*: 5-10 cc. of the extract were measured into 50 cc. beaker, evaporated on the water-bath to dryness, and the residue was extracted 3 times with ether. The extracts thus obtained were transferred into a Folin-digestion-tube. After the evaporation of ether had been completed in the water-bath, 1.5 cc. of a mixture of equal parts of conc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and conc.  $\text{HNO}_3$  were added and the digestion was carried out as usual. Hereafter  $\text{H}_3\text{PO}_4$  was determined nephelometrically by the method of Bloor (1922).

2) *For cholesterol and fatty acid*: 10-15 cc. of the extract were measured into 50 cc. beaker to which 0.1 cc. of conc. NaOH solution (prepared from metallic sodium) was added after the removal of the smell of ether by evaporation, and the content of the beaker was mixed well and saponified at 100°C. for 10-15 minutes. Cholesterol and fatty acid in this mixture were then determined by Bloor's method (1918), except that the volume of alcohol extract of fatty acid (in form of soap) was made up to 10-25 cc. instead of 5 cc. in the original procedure and that oleic acid (1 mg. in 5 cc.) alone was used as the standard of fatty acid.

### 5. *Analysis of blood.*

The blood used for analysis was taken out of A. femoralis with the aid of an injection-syringe and was weighed in 50 cc. beaker of known weight, added with 5 cc. absolute alcohol and dried in a drying-closet at 100°C to constant weight. It was then ground in a porcelain mortar and a certain amount of the ground powder was weighed in a weighed fat-free paper-case. The extraction with alcohol and with ether was carried out as in the case of the dried tumor sample. The treatment after extraction was also the same as in tumor, the only difference being the use of 10 cc. of extract for lecithin and of 20 cc. for cholesterol and fatty acid determination.

### 6. *Determination of free cholesterol in the tumors.*

20-25 cc. of the extract were measured into a 50 cc. beaker, evaporated into 2-3 cc. An excess of 1% digitonin alcohol solution was then added to the extract, mixed well and left aside for 2-3 hours. The precipitates thus obtained were filtered through the hardened filter paper (5 cm. diameter), washed with ether and alcohol several times, and its cholesterol was extracted with xylol at 170°C for 3-4 hours in a small extraction apparatus, specially designed for this purpose. After the xylol had been carefully evaporated at 100°C in a drying-closet the remaining cholesterol was dissolved in chloroform and determined colorimetrically as usual. By this method a trustworthy value of cholesterol is obtained if the evaporation of xylol is carried out carefully.

## III. THE TAKES AND THE GROWTH OF THE IMPLANTED TUMOR IN RATS.

Sweet, Carson-White and Saxon (1913-1915) reported, that "the susceptibility of rats and mice to the transplantable tumors and the rate of the growth of the tumors can be influenced by proper diet, and further, that the tumor cells are subjected to the same laws of growth as the normal somatic cells, the only

difference being that the tumor cells possess a stronger avidity for the unknown substance in the diet, which are essential for cell growth."

Rous (1914) reported that "the growth of the transplanted tumors generally can be prevented or retarded by underfeeding the new host, but the Flexner-Jobling rat carcinoma grown for a short period was unaffected by the most rigorous underfeeding." The opinion maintained by Bashford, Murray and Bowen (1907), that there is rhythmical rise and fall of the percentage of growing tumors, was discussed by Fleisher (1914), who claims that the rhythmical appearance depends in most cases on an experimental error.

Since it seems to the writer to be of interest to learn whether such postulations as above mentioned may be correct or not, some observations have been done in the course of analytical studies of the tumors.

1. *The relation of the age of tumors to their takes with some other observations.*

The suspension of the healthy portion of the Flexner-Jobling carcinoma, which showed only a slight softening in its centre, was subcutaneously inoculated into 10 rats weighing about 50-60 grams. Three of them were susceptible to tumor. The tumors were enoculated then on the 18th and 23rd day respectively after inoculation, and again implanted at once into each group of 15 rats weighing about 50 grams. According to the result of this experiment, the takes were found in 14 rats in the case of the former, while in the latter only four cases of the takes occurred. Repeating the same experiments several times, the identical result was always obtained, that is, the rate of takes of tumors in the rats is greater in the case of inoculation of the younger tumor than in the case of older, and that the takes are somewhat better for the denser tumor than for the softer, when the age of implanted tumor is the same. In other words the takes were nearly 80-100% in the case of the tumors within 20 days of age, while in

the case over 22 days of age they remained only within 10-20%. As to the relation of sex to the takes, no difference was observed. As to the growth the following points were noticed. The volume of the tumors increased at first along the direction of the injection of the syringe, then gradually expanded to the inguinal portion. And in the case of the large rats weighing about 100-150 grams, the growth of tumors did not always begin at the inoculated locality, but often appeared in the inguinal portion. The growing process continued usually incessantly, but it was sometimes interrupted for 1-2 days.

Season seems to have some bearing on the takes and growth, both being better in winter than in summer.

## 2. *The relation of the age and nutrition of rats to the takes and growth of the transplanted tumors.*

Two groups of rats under normal and subnormal feeding, each consisting of 15 young rats (2-3 months old) and 15 older rats (7-10 months old), were inoculated with tumor suspension. From the results of these experiments the takes of the tumors in the case of normal feeding were found to be 100% regardless the ages of the animals. The growth of the tumors seemed however to be somewhat better in the old than in the young animals. The takes in hungry rats were the same in the old rats as in the case of normal feeding rats, while in young hunger rats takes were evidently lower, the takes being only 3 out of 15 in the first experiment, and 10 out of 15 in the second. The growth of tumors in hungry rats was somewhat retarded in many cases, though the growth of tumors in hungry old rats could overcome that of normal feeding young rats, about 15-20 days after the inoculation. In short, the reduction of the takes and the retardation of the growth, were distinctly visible in the hungry young rats.

3. *Influence of flesh-powder feeding, cholesterol, lanolin- and lecithin-injection on the growth of the tumors.*

40 rats were inoculated with tumor. Seven of them were fed on flesh powder, which replaced unpolished rice of normal ration, while all other rats were fed on normal diets and injected with one of the following solutions into subcutaneous tissue of the opposite side of tumor.

a. *1% lecithin suspension*: 1 gm. of lecithin (Merck) was emulsified in 100 cc. of 0.8% NaCl solution.

b. *Cholesterol-suspension*: The ethereal solution of pure cholesterol was poured drop by drop into the 0.8% NaCl solution under constant stirring. The solution was then heated under stirring in the water-bath until the smell of ether disappeared and 1% cholesterol suspension was thus prepared.

c. *Lanolin-solution*: A certain amount of lanolin was mixed with a suitable amount of gummi arabicum and the mixture was melted on the water-bath. The NaCl-solution was then added under stirring and about 1% lanolin suspension was obtained.

1 cc. of each of these solutions was injected into the animal once every day. The results of duplicate experiments, arranged in the order of effectiveness to argument the growth, are as follows:—

I. Experiment: lanolin > flesh > cholesterol > control > lecithin

II. Experiment: flesh > lanolin > lecithin, control > cholesterol

4. *Summary and discussion.*

1. From all the above results, the takes of the transplanted tumors in the rats seem to depend simultaneously on the vigour of the tumor, the nutrition and the age of rats. The rate of takes is the same notwithstanding malnutrition in the large rats weighing about 120-200 grams, while in the young rats about 50-60 grams of weight the rate of takes depends distinctly on the nutrition.

2. As to the growth of tumors, it is generally better in the old rats than in the young, and also better in the normal feeding than in the hungry. This result agrees with that obtained by Sweet in the point, that the growth of tumors can be influenced by diets. In regard to the susceptibility, however, his findings were not verified by us and we found on the contrary that it may be unaffected by hunger at least in the large rats in our case. Rous 1913 reported that the growth of Flexner-Jobling rat carcinoma, when once grown, is unaffected by the most rigorous underfeeding. But in our case, the growth of the tumor in the young rats was retarded by underfeeding, at least for the initial 18-20 days.

3. The growth of tumors was favoured by the flesh feeding and lanolin injection, but as to the influence of cholesterol and lecithin on the tumor growth, such a result as Robertson and Burnett's could not be obtained. Since the individual differences are recognizable in some degree on the takes and growth of the transplanted tumor, even when the same tumor is inoculated into the rats of the same generation, great precaution should be taken to establish any theory on this matter.

#### IV. DISTRIBUTION OF SOME FATTY SUBSTANCES IN THE RAT CANCERS.

Hitherto the analysis of tumor tissue has not been done much. This is especially the case with fatty substances of tumor.

Bennett (1914) reports that the cholesterol content of cancer does not markedly vary by its injection, while it increases with the age of the tumors and that its peripheral or actively growing portion contains less cholesterol than its central one. Bullock and Cramer (1914) found that the cholesterol is much more abundant in slowly growing carcinoma than in rapidly growing ones, and that with the phosphatide this relation is reverse.

In the following experiments, the change of the distribution of fatty substances in the tumor at various stage of its growth

and its relation to the age and nutrition of the host were considered.

1. *The young tumors in young and old rats under the normal and subnormal feeding.*

Two groups of rats weighing about 50–60 grams and 120–170 grams were inoculated with the same tumor suspension and one half of each group was fed on normal diets and the other half on subnormal diets.

Lecithin, cholesterol and fatty acid of the tumor were determined on the 16–17th day after inoculation by the already mentioned methods and the following result was obtained.

The table shows that in the value of lecithin, cholesterol and fatty acid there are no large differences due to age and feeding observable. The percentage of the solid substances reaches to about 20–21% of wet cancer tissue; that of  $H_3PO_4$  derived from lecithin, to 0.17% (in wet) or 0.8% (in dried); that of cholesterol, to 0.26% (in wet) or 1.2% (in dried); that of fatty acid, to 5–6% (in wet) or 25% (in dried), though its value varies individually in some large degree; and the ratio  $\frac{\text{lecithin}}{\text{cholesterol}}$  is about 5.

2. *The middle-aged tumors in the young and old rats under normal and subnormal feeding.*

The fatty substances of the tumors were determined on 19–22nd day after inoculation by the same methods as the above, and the resumé is given in the following table.

Also we can not recognize here any remarkable differences in the distribution of the fatty substances depending on the age of rats and feedings. On comparing with table I, the percentage of the solid substances is 1–2% lower in this case; that of  $H_3PO_4$  only slightly lower; that of cholesterol a little higher; that of fatty acid remarkably lower, and the ratio  $\frac{\text{lecithin}}{\text{cholesterol}}$  is somewhat lower.

TABLE I.

Feeding	Age of rats	Weight of rat at inoculation		Days after inoculation	Consistency and appearance	Solid substance per cent	Lecithin as $\text{H}_3\text{IO}_4$ per cent		Cholesterol per cent		Fatty acid per cent		Ratio lecithin cholesterol
		gms.	gm.				in wet	in dried	in wet	in dried	in wet	in dried	
Normal	Young	48	65	17	dense	21.582	0.138	0.639	0.215	0.996	3.725	17.265	5.134
		50	70	"									
		39	61	"									
		48	68	"		21.385	0.222	1.030	0.300	1.404	6.242	28.275	5.869
		53	72	"									
	Old	52	67	"	"	20.630	0.168	0.815	0.258	1.251	5.380	26.081	5.209
		48	60	"									
		54	65	"									
		125	145	16		21.755	0.141	0.649	0.223	1.026	4.624	21.255	5.060
		140	150	"									
Hunger	Young	117	137	"	"	21.820	0.205	0.884	0.282	1.209	6.273	26.963	5.816
		108	202	"									
		120	138	"		20.325	0.153	0.753	0.262	1.213	4.365	21.447	4.674
		136	150	"									
		52	48	17									
	Old	60	50	"	"	20.894	0.162	0.775	0.273	1.307	8.235	39.415	4.744
		48	50	"									
		57	49	"									
		59	60	"		21.546	0.173	0.803	0.270	1.252	3.363	15.601	5.127
		49	42	"									
Hunger	Old	149	130	16	"	21.782	0.177	0.811	0.239	1.095	2.185	10.035	5.926
		183	178	"									
		102	97	"		21.044	0.172	0.818	0.206	1.410	6.434	28.196	4.640
		93	85	"		21.260	0.233	1.038	0.329	1.549	5.600	26.337	5.087
		185	180	"		18.900	0.194	1.028	0.276	1.463	4.890	15.823	5.619
		155	147	"		18.835	0.150	0.796	0.210	1.273	6.069	32.223	4.985

TABLE II.

Feeding	Age of rats	Weight of rat at inoculation		Days after inoculation	Consistency and appearance	Solid substance per cent	Lecithin as H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> per cent		Cholesterol per cent		Fatty acid per cent		Ratio Lecithin Cholesterol
Normal	young	gm	gm.				in wet	in dried	in wet	in dried	in wet	in dried	
		58	76	20	dense	17.320	0.204	(1.179)	0.290	(1.677)	0.634	(3.660)	5.630
		52	74	"	"								
		57	64	"	"								
		45	60	"	"	17.211	0.198	(1.151)	0.300	(1.749)	0.651	(3.782)	5.205
	old	42	54	"	"	18.083	0.104	(0.576)	0.208	(1.153)	2.223	(12.300)	3.999
		50	55	"	"								
		71	85	"	"								
		100	113	20	dense	17.366	0.172	(0.988)	0.280	(1.612)	1.680	(9.671)	4.905
		123	143	"	"	18.231	0.170	(0.933)	0.301	(1.654)	2.280	(12.518)	4.520
Hunger	young	150	170	"	"	18.642	0.165	(0.835)	0.285	(1.521)	3.052	(16.370)	4.631
		135	156	"	"	18.334	0.143	(0.780)	0.250	(1.364)	2.562	(13.977)	4.578
		81	106	21	"	17.432	0.134	(0.769)	0.159	(0.911)	1.844	(10.579)	6.751
		72	64	21	dense	18.396	0.154	(0.837)	0.179	(0.975)	4.309	(23.423)	6.802
		86	78	"	"	16.992	0.090	(0.527)	0.125	(0.732)	1.605	(9.418)	5.762
	old	75	67	"	"	17.041	0.130	(0.767)	0.169	(0.997)	0.617	(3.630)	6.154
		72	69	22	"	16.992							
		126	117	21	dense	18.239	0.109	(0.594)	0.163	(0.899)	5.311	(29.254)	5.294
		167	155	"	"	18.030	0.124	(0.693)	0.192	(1.072)	1.032	(11.288)	5.155
		150	163	"	"								
		143	156	"	"								

### 3. *The old tumors in the normal feeding rats.*

Since the distribution of fatty substances in the tumors was not influenced by normal and subnormal diets, as is in the above experiments shown, the detremination was carried out here with the normal feeding rats. In the centre of the tumors taken out later than 25 days after inoculation the softening had already occurred in more or less degree; that is, some of them inclined to soften only, while some others were bloody fluid and still some others were caseous.

Each of these tumors was ground thoroughly and an aliquot mass of it was used for analysis and the following result was obtained.

Also in this result there is no remarkable variation in regard to the distribution of each of the fatty substances, but on comparing with that of the previous experiments, the following points are noticed. The percentage of  $H_3PO_4$  almost does not vary in both cases, though slightly lower in this, while that of cholesterol increases about 2 times, so that the ratio  $\frac{\text{lecithin}}{\text{cholesterol}}$  is very low.

In the next experiment, the writer determined separately the fatty substances in the centre and crust of two tumors on 52nd day after inoculation and the following result was obtained. Feeding was normal.

As can be seen from this result, the lecithin value is remarkably lower in the centre than in the periphery, but the average value is nearly the same as in the case of the tumors as a whole. The cholesterol value is evidently higher in the centre than in the periphery, and this agrees not only with that of all the above experiments, but also entirely with that of Bennett (1914).

### 4. *The tumors in the cases of the flesh powder feeding or of injection with cholesterol, lanolin or lecithin.*

The tumors in the rats injected with cholesterol, lanolin or lecithin and those in the rats fed on flesh powder were analysed

TABLE III.

Weight of rats at inoculation		Days after inoculation	Consistency and appearance	Solid sub- stance per cent	Lecithin as $H_3PO_4$ per cent		Cholesterol per cent		Fatty acid per cent		Ratio lecithin cholesterol
					in wet	in dried	in wet	in dried	in wet	in dried	
gm.	gm.										
79	95	25	inclined to soften	17.222	0.109	(0.631)	0.329	(1.331)	2.037	(11.831)	3.790
60	84	"	"	16.290	0.104	(0.641)	0.265	(1.630)	1.547	(9.498)	3.148
32	57	"	slightly soften	17.111	0.073	(0.422)	0.355	(2.071)	3.624	(21.174)	1.631
28	53	"	soften	17.012	0.114	(0.660)	0.344	(2.020)	6.450	(37.903)	2.613
31	56	"	total soften	17.050	0.077	(0.449)	0.332	(2.243)	1.564	(9.175)	1.600
39	56	"	bloody soften	18.023	0.086	(0.470)	0.367	(2.037)	1.223	(6.789)	1.846
28	50	"	slight caseous	18.001	0.124	(0.666)	0.577	(3.207)	2.536	(14.100)	1.660
31	50	"	slightly soften	16.850	0.101	(0.725)	0.238	(1.846)	1.679	(13.028)	3.144
32	57	"	"	17.021	0.134	(0.767)	0.363	(2.156)	4.653	(27.601)	2.843
36	67	"	slight caseous	16.980	0.115	(0.663)	0.276	(1.614)	4.723	(27.985)	3.384
28	53	"	total caseous	17.131	0.122	(0.625)	0.402	(3.347)	1.370	(7.956)	2.131
127	141	26	inclined to soften	19.839	0.127	(0.642)	0.806	(4.065)	3.629	(18.699)	1.261
35	78	42	caseous	18.371	0.128	(0.696)	0.767	(4.175)	1.461	(7.952)	1.333
30	59	42	caseous	17.548	0.123	(0.703)	0.292	(1.667)	1.731	(9.869)	3.376
121	152	56	total soften	16.559	0.116	(0.702)	0.337	(2.218)	1.861	(11.239)	2.533
120	150	56	"	16.311	0.117	(0.695)	0.438	(2.607)	2.001	(11.918)	2.133
108	148	56	"	16.083	0.092	(0.576)	0.367	(2.285)	1.549	(9.633)	2.013

TABLE IV.

Weight of milk in milk can	Consistency	Solid sub- stance per cent	Lactation no. $H_2PO_4$		Cholesterol per cent	Fatty acid per cent		Lactin per cent
			in wet	in dried	in wet	in dried	in wet	
35	Cream, mass in Periph., dense	14.304	0.631	(0.214)	0.350	(2.752)	2.503	(19.520)
		15.600	0.210	(1.016)	0.145	(0.335)	7.392	(10.775)
	Cream, medium Periph., wet	9.821	0.091	(0.631)	0.227	(2.312)	2.012	(20.327)
41		15.392	0.167	(0.367)	0.352	(1.914)	2.402	(13.604)

TABLE V.

Weight of milk at incubation	Incubation	Feeding	Lactation	Lactin $H_2PO_4$		Cholesterol per cent	Fatty acid per cent		Lactin per cent
				in wet	in dried	in wet	in dried	in wet	
6	70	112	13.356	0.214	(1.160)	0.303	(1.635)	3.100	(16.165)
6	75	135	13.403	0.172	(0.363)	0.323	(1.664)	2.611	(44.373)
6	98	131	17.255	0.207	(1.207)	0.285	(1.576)	3.760	(21.572)
6	69	131	17.352	0.213	(1.237)	0.326	(1.316)	4.372	(22.395)
4	75	112	13.559	0.172	(0.523)	0.303	(1.635)	2.310	(17.277)

for their fatty substances on the 16-21st day after inoculation and the result was as shown in table V.

From this table no special variation in the value of fatty substances can be seen in any case. The following points are also noticeable as a whole.

1. The lecithin and fatty acid value in this case is equal to that of the tumors 16-17 days old under normal feeding.

2. The cholesterol value is equal to that of the tumors 25 days old.

3. The ratio  $\frac{\text{lecithin}}{\text{cholesterol}}$  lies between those of the tumors 16-17 and 25 days old.

### 5. The free cholesterol of the tumors.

To see to what extent the cholesterol in the tumors exists in free state, the writer determined the amount of free cholesterol by the digitonin method, which has already been described in detail. The result was as follows.

TABLE VI

Weight of rats at inocul.	Weight of rats at sacred	Feeding	Days after inocula- tion	Concentra- tion and appear- ance	Total cholesterol by Rios	Free choles- terol by digitonin method	Free cholesterol %
						mg	
11	35	normal	20	clear	3.285	2.710	82.32%
50	35	"	20	"	"	"	"
55	45	"	20	inclined to opaque	3.350	3.570	93.37%
70	35	"	25	"	3.700	3.490	"
60	35	"	25	"	3.860	3.430	88.71%
121	172	"	30	permanent opaque	5.600	4.700	83.71%

From this result it is clear that the most part of cholesterol is free in the tumors.

The writer seems to be able to draw the following conclusions from the above experiments.

1). The percentage of lecithin as a whole does not vary during the process of the growth of tumors.

2). That of cholesterol, as already known, increases with the age of the tumors and the most part of it is free.

3). Fatty acid decreases gradually with the age of the tumors and reaches a constant value. (2.3% in wet or 13.5% in dried.)

#### V. DISTRIBUTION OF THE FATTY SUBSTANCES IN THE BLOOD OF RATS.

##### 1. *The blood of the normally and subnormally fed rats.*

The blood of the rats fed on normal and subnormal diets was analysed for its fatty substances by the method already described and the following result was obtained.

As will be seen from the table the average value of  $H_3PO_4$  derived from lecithin is about 0.1% of the solid substance at normal feeding, but it was reduced almost half at malnutrition.

The cholesterol value is about 0.2% of the solid in both cases, the ratio  $\frac{\text{lecithin}}{\text{cholesterol}}$  is greater in normal nutrition than in the hungry, but the fatty acid value is somewhat larger in the hungry than in the normal.

##### 2. *The blood of the carcinoma rats.*

In the blood of the carcinoma rats fed on normal diets and injected with lecithin, cholesterol and lanolin until 3 days before analysis and in the blood of those fed on flesh powder, the fatty substances were determined and the result was as follows:—

From this the lecithin value of the blood in the carcinoma rat is generally grater than that of the normal rat blood; the cholesterol value is much greater in the blood of the rat injected with lanolin or cholesterol, while it is lowest in that of the lecithin injected rats. This variation of the cholesterol value in the blood of the rats injected with cholesterol, lanolin and

TABLE VII.

Number of rats used for analysis	Weight of rat smallest largest	Feeding	Solid substance per cent	Lecithin as $H_3PO_4$ per cent in dried	Cholesterol per cent in dried	Fatty acid per cent in dried	lecithin cholesterol Ratio
5	<sup>mg.</sup> 50.....94	normal	20.463	0.102	0.182	1.530	4.132
5	<sup>mg.</sup> 121.....210	"	20.736	0.100	0.196	1.132	4.125
		average	20.600	0.101	0.189	1.331	4.129
4	51.....68	hunger for 1 week	20.860	0.050	0.093	1.332	4.320
2	94.....110	" " "	20.039	0.056	0.115	1.612	3.905
3	50.....53	" " 2 weeks	20.442	0.087	0.208	1.242	3.315
2	190.....215	" " "	21.687	0.063	0.145	1.750	3.476
		average	20.757	0.064	0.142	1.485	3.762
2	71.....82	normal feeding at 12 days after enoculat.	19.535	0.038	0.161	1.087	4.369

TABLE VIII.

Number of rats used for analysis	Weight of rat smallest largest	Feeding	Injection	Days after inoculation	Solid substance per cent	Lecithin as $H_3PO_4$ per cent in dried	Cholesterol per cent in dried	Fatty acid per cent in dried	lecithin cholesterol Ratio
10	<sup>mg.</sup> 50.....210	normal	—	no tumor	20.600	0.101	0.189	1.331	4.129
8	55.....172	"	—	20-74	19.009	0.112	0.259	1.742	4.066
4	67.....112	flesh powder	—	19-21	21.232	0.151	0.223	1.479	5.949
4	75.....135	normal	cholesterol	19-21	20.509	0.142	0.277	1.432	3.861
3	125.....131	"	lanolin	19-21	19.155	0.144	0.336	1.493	3.352
5	71.....131	"	lecithin	19-21	17.693	0.150	0.173	2.029	7.068

lecithin is especially interesting, when we recall their influence on the growth of the tumors.

#### SUMMARY.

1. The relation of feeding and the age of tumors and rats on the takes and the growth of the transplanted tumors in the rats were studied, leading to the conclusion that the takes of tumors in old rats (7-10 months old) were unaffected by hunger, and that the growth of the tumors generally were somewhat retarded for a short period by underfeeding.

2. The analytical results of the distribution of the fatty substances of the tumors in 3 periods 16-17, 20-22, 25 and more days after inoculation were reported. And the lecithin value was nearly constant throughout 3 periods, while the cholesterol increased with the age of the tumor, so that the ratio  $\frac{\text{lecithin}}{\text{cholesterol}}$  decreased with age.

3. The cholesterol in the tumor exists mostly in uncombined state.

4. The fatty substances of the tumors did not show any appreciable variations when the rat had been injected with cholesterol, lanolin or lecithin or fed on flesh powder.

5. The fatty substances of the blood in the normal and carcinoma rats were determined and the cholesterol content of the blood was evidently higher in the rats injected with cholesterol and lanolin, but lower in the rats injected with lecithin.

The writer wishes to thank Professor S. Kakiuchi for advice throughout the course of the investigation.

#### REFERENCES.

- Bennett, C. B. (1914): Journ. Biol. Chem., 17, 13.  
Bloor, W. R. (1918): Journ. Biol. Chem., 39, 33.  
Bloor, W. R. (1922): Journ. Biol. Chem., 52, 191.  
Bullock, and Cramer (1914): Proc. Royal Soc., London (B). 87, 236.  
Fleisher, M. S. (1914): Zeitsch. f. Krebsforschung. 14, 8.

- LUDEN, G. (1916). Journ. Cancer Research. 1, 369.
- ROBERTSON, T. B. and BURNETT, T. C. (1913): Journ. Exper., Med., 17, 344.
- ROBERTSON, T. B. (1916): Journ. Biol. Chem., 25, 635, 647.
- ROUS, P. (1914): Journ. Experim. Med., 20, 433.
- SWEET, J. E., CARSON-WHITE, E. P. and SAXON, G. J. (1913): Journ. Biol. Chem., 15, 181.
- SWEET, J. E., CARSON-WHITE, E. P. and SAXON, G. J. (1915): Journ. Biol. Chem., 21, 309.



## INDEX TO VOLUME IV.

- A**BSORPTION, The studies on the relation between the — of carbohydrate and the blood sugar. 1.
- ADACHI, Masashi and MITYAKE, Koji. On the influence of three manurial ingredients upon the hydrogen-ion concentration of the cell sap of oats and flax. 317.
- Adrenalin, Der Einfluss von kohlenhydratarmer Kost und von — injektion auf die Zucker-ausscheidungsschwelle. 139.
- Adrenalininjizierte Hungertiere, Die Lipinverteilung im Gewebe bei — n. 107.
- Alkalizufuhr, Über den Einfluss der duodenalen auf die Magensekretion. 385.
- Amylase, Über die Spaltung der Stärke durch —. II. 123.
- Anemia, The relationship between — and fibrinogen content of blood. 463.
- Antineuritic factor, The comparison of Katjang hijdo with Yaenari in Vitamin B (—) content. 271.
- AZUMA, Toshio. Studies on serum lipase. 239.
- B**ANG, Zur Frage über das Verhalten der — sehen Micro-Kjeldahl-methode. 33.
- Bleeding, The amount of fibrinogen and erythrocytes in the blood of rabbits by the successive —s. 465.
- Blood, The fibrinogen contents of the — of hematorporphyrin rabbits. 467.
- , The relationship between anemia and fibrinogen content of —. 463.
- Blood sugar, The studies on the relation between the absorption of carbohydrate and the —. 1.
- Blut, Über die glykolytische kraft des —es. IV. Mitteilung. Insulin und Glykolyse der Erythrozyten. 429.
- , Über die glykolytische Kraft des —es. III. Mitteilung. 411.
- Blutserum, Über den Einfluss des Insulins auf einige Bestandteile des —s. 333.
- Blutzucker, Über den — des Kaninchens bei vitaminfreier Ernährung 323.
- C**ARBONHYDRATE, The studies on the relation between the absorption of — and the blood sugar. 1.
- Carcinoma, Studies on the rat —. 481.
- Cell sap, On the influence of three manurial ingredients upon the hydrogen-ion concentration of the — of cats and flax. 317.
- CO<sub>2</sub>, A revised titrimetric method of estimating — in small amount. 473.
- D**AISY, Yen and Hsien, Wu. Studies of dematuration of proteins. I. Some new observations concerning the effects of dilute acid and alkalis on proteins. 345.
- Denaturation, Studies of — of proteins. 345.
- Dikarbonsäure, Über das Verhalten der

- Malonsäure und einiger ——— in im Tierkörper bei Leberdurchblutung. 441.
- Dünndarm, Über die Resorption verschiedener Salzlösungen im ———. 277.
- FATTY** substances, Distribution of some ——— in the rat cancers. 488.
- , Distribution of the ——— in the blood of rats. 496.
- Fettbestimmung, Methodik der ———. 46.
- Fettstoffe, Über den Einfluss des Nahrungsfettes auf die chemische Natur der ——— im Tierkörper. 43.
- Fibrinogen, The ——— contents of the blood of hematoporphyrin rabbits. 467.
- , The determination of ———. 467.
- , The relationship between anemia and ——— content of blood. 463.
- Flax, On the influence of three animal ingredients upon the hydrogen-ion concentration of the cell sap of oats and ———. 317.
- GLYKOLYTISCHE** Kraft, Über die ——— des Blutes. IV. Mitteilung. Insulin und Glykolyse der Erythrozyten. 429.
- , Untersuchungen über die Beziehung zwischen der ——— und der O<sub>2</sub>-Zehrung der Erythrozyten. 411.
- HARADA**, Ken. Über die Spaltung der Stärke durch Amylase. II. 123.
- Harnsäureausscheidung, Über den Einfluss der Leukozytose auf die ———. 173.
- Hematoporphyrin, Chemical studies on ——— rabbits. 225.
- , The fibrinogen content of the blood of ——— rabbits. 467.
- HORIUCHI, Tanoshi. The studies on the relation between the absorption of carbohydrate and the blood sugar. 1.
- HOSOKAWA, Masasuke. Über den Blutzucker des Kaninchens bei vitaminfreier Ernährung. 323.
- Hsien, Wu and Daisy, Yen. Studies of denaturation of proteins. 1. Some new observations concerning the effects of dilute acids and alkalies on proteins. 315.
- Hydrogen-ion concentration, On the influence of three manurial ingredients upon the ——— of the cell sap of oats and flax. 317.
- INSULIN**, ——— und Glykolyse der Erythrozyten. 429.
- , Über den Einfluss des Insulins auf einige Bestandteile des Blutserums. 333.
- Iwao, Masao. Studies on the rat carcinoma. 481.
- KASAMORI**, Shugo. Zur Frage über das Verhalten des Bangschen Mikro-Kjeldahlmethode. 33.
- Katjang hidjo, The comparison of ——— with Yaenari in Vitamin B (antineuritic factor) content. 271.
- KAWASHIMA, Yoshikane. Über die glykolytische Kraft des Blutes. III. Mitteilung. Untersuchungen über die Beziehung zwischen der glykolytischen Kraft und der O<sub>2</sub>-Zehrung der Erythrozyten. 411.
- , ———. Über die glykolytische Kraft des Blutes. IV. Mitteilung. Insulin und Glykolyse der Erythrozyten. 429.

- Körperfett, Natur des —es bei normalen Mäusen. 52.
- , Natur des —es bei hungernden Mäusen. 53.
- , Über den Einfluss des Nahrungsfettes auf das gesamte —. 46.
- Kjeldahlmethode, Zur Frage über das Verhalten der Bangschen Micro —. 33.
- LEBERDURCHBLUTUNG**, Über das Verhalten der Malonsäure und einiger Dikarbonsäuren im Tierkörper bei —. 411.
- Leukozytose, Über den Einfluss der — auf die Harnsäure ausscheidung. 173.
- Lipase, Studies on Serum —. 239.
- Lipinverteilung, Die — im Gewebe bei Adrenalin-injizierten Hungertieren. 107.
- , Die — im Gewebe von normalen, hungernden & lipingefütterten Tieren. 73.
- MAGENINHALT**, Fraktionierte Untersuchungen des —es bei duodenaler Alkalizufuhr. 399.
- Magensekretion, Über den Einfluss der duodenalen Alkalizufuhr auf die —. 385.
- Magensaftsekretion, Über den Einfluss der rektalen Alkalizufuhr auf die —. 199.
- Malonsäure, Über das Verhalten der — und einiger Dikarbonsäuren im Tierkörper bei Leberdurchblutung. 411.
- Manurial ingredients, On the influence of three — upon the hydrogen-ion concentration of the cell sap of oats and flax. 317.
- MATSUYAMA, Toshitane, Über den Einfluss der duodenalen Alkalizufuhr auf die Magensekretion. 385.
- , —. Über den Einfluss der rektalen Alkalizufuhr auf die Magensaftsekretion. 199.
- Micro-Kjeldahlmethode, Zur Frage über das Verhalten der Bangschen —. 33.
- MIYAKE, Koji and ADACHI Masashi, On the influence of three manurial ingredients upon the hydrogen-ion concentration of the cell sap of oats and flax. 317.
- MOMOSE, Gore, Über das Verhalten der Malonsäure und einiger Dikarbonsäuren im Tierkörper bei Leberdurchblutung. 411.
- MORITA, Choichi, Über die Lipinverteilung in den Geweben unter verschiedenen Bedingungen. I. Die Lipinverteilung in Gewebe von normalen, hungernden und lipingefütterten Tieren. 73.
- , —. Über die Lipinverteilung in den Geweben unter verschiedenen Bedingungen. II. Die Lipinverteilung im Gewebe bei Adrenalininjizierten Hungertieren 107.
- NAHRUNGSFETT**, Über den Einfluss des —es auf die chemische Natur der Fettstoffe im Tierkörper. 43.
- NAKAYAMA, Mototaro, Der Einfluss von kohlenhydratarmer Kost und von Adrenalininjektion auf die Zuckerausscheidungsschwelle. 139.
- , —. Einfluss der Vagusdurchschneidung auf die Zuckerausscheidungsschwelle. 163.
- , —. Über den Einfluss der

- Schwangerschaft auf die Zuckerausscheidungsschwelle. 185.
- NAKASHIMA, Komajiro. Über die Resorption verschiedener Salzlösungen im Dünndarm. 277.
- NISHI, S. A revised titrimetric method of estimating  $\text{CO}_2$  in small amount. 473.
- OATS**, On the influence of three manurial ingredients upon the hydrogen-ion concentration of the cell sap of — and flax. 317.
- OHTA, Kichiya. Chemical studies of hematoporphyrin rabbits. 225.
- , —. Chemical studies on hematoporphyrin rabbits. II. The relationship between anemia and fibrinogen content of blood. 463.
- , —. Chemical studies on hematoporphyrin rabbits. III. The fibrinogen contents of the blood of hematoporphyrin rabbits. 467.
- O - Zehrung, Untersuchungen über die Beziehung zwischen der glykolytischen Kraft und der — der Erythrocyten. 411.
- PHOSPHOLIPINE**, Über den Einfluss des Nahrungsfettes auf die — im Tierkörper. 63.
- , Vergleichende Untersuchung über die — verschiedener Tierarten. 68.
- Protein, Studies of denaturation of —. 345.
- Puffer, Einfluss des Phosphat- —s auf die glykolytische Kraft und die Atmung der Erythrocyten. 423.
- REKTALE** Alkalizufuhr, Über den Einfluss der — — auf die Magensaftsekretion. 199.
- Resorption, Über die — verschiedener Salzlösungen im Dünndarm. 277.
- SAKURAI, T. FURUYA, A., and INOUE, K. Über den Einfluss des Insulins auf einige Bestandteile des Bluteserums. 333.
- Salzlösungen, Über die Resorption verschiedener — im Dünndarm. 277.
- Senshu, Judo. The comparison of Katjang hidjo with Yaenari in Vitamin B (antineuritic factor) content. 271.
- Serum lipase, Studies on —. 239.
- Schwangerschaft, Über den Einfluss der — auf die Zuckerausscheidungsschwelle. 185.
- Shim, H. S. Über den Einfluss der Leukozytose auf die Harnsäureausscheidung. 173.
- SHIOJI, Eikichi. Über den Einfluss des Nahrungsfettes auf die chemische Natur der Fettstoffe im Tierkörper. 43.
- Stärke, Über die Spaltung der — durch Amylase. II. 123.
- TITRIMETRIC** method, A revised — of estimating  $\text{CO}_2$  in small amount. 473.
- VAGUSDURCHSCHNEIDUNG**, Einfluss der — auf die Zuckerausscheidungsschwelle. 163.
- Vitamin B, The comparison of Katjang hidjo with Yaenari in — (antineuritic factor) content. 271.
- Vitaminfreie Ernährung, Über den

- Blutzucker des Kaninchens bei  
—, Ernährung. 323.
- WEINSÄURE**, Über das Verhalten  
der d-Zuckersäure und d- — in  
der Leber. 455.
- Yaenari, The comparison of Katjang  
hidjo with — in Vitamin B  
(antineuritic factor) content. 271.
- Zucker, Der Einfluss von kohlenhyd-  
ratarmer Kost und Adrenalininjek-  
tion auf die — -ausscheidungs-  
schwelle. 139.
- Zuckerausscheidungsschwelle, Einfluss  
der Vagusdurchschneidung auf die  
—, 163.
- , Über den Einfluss der Schwan-  
gerschaft auf die —. 185.
- Zuckersäure, Über das Verhalten der  
d- — und d-Weinsäure in der  
Leber. 455.



ANNOTATIONES  
ZOOLOGICAE JAPONENSES

PUBLISHED BY  
THE TOKYO ZOOLOGICAL SOCIETY,  
COLLEGE OF SCIENCE, IMPERIAL UNIVERSITY OF TOKYO.

Subscription Price: \$6.00 per volume.

---

JOURNAL  
OF  
THE CHEMICAL SOCIETY  
OF JAPAN

(JAPANESE)  
PUBLISHED BY  
THE CHEMICAL SOCIETY OF JAPAN,  
COLLEGE OF SCIENCE, IMPERIAL UNIVERSITY OF TOKYO.

Subscription Price: \$4.00 per volume.

---

ACTA PHYTOCHIMICA

PUBLISHED BY  
THE IWATA INSTITUTE OF PLANT BIOCHEMISTRY.

Subscription Price: \$5.00 per volume

(Remittance should be sent to Maruzen & Co. Ltd.,  
14 Tori Sanchoime, Nihonbashi, Tokyo)

---

外字生化學雜誌第四卷第參號

大正十四年五月二十五日印刷  
大正十四年五月二十八日發行

東京市牛込區市谷加賀町一丁目十一番地  
編輯者 柿 内 三 郎  
發行所

東京市神田區美土代町二丁目一番地  
印刷者 島 連 太 郎

東京市神田區美土代町二丁目一番地  
印刷所 三 秀 會

